

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

Diseño y desarrollo de productos cárnicos con perfil lipídico optimizado. Evaluación del efecto funcional en humanos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gonzalo J. Delgado Pando

Directores

Francisco Jiménez Colmenero
Begoña Olmedilla Alonso
Francisco José Sánchez Muniz

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



**DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS
CON PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO. EVALUACIÓN
DEL EFECTO FUNCIONAL EN HUMANOS**

TESIS DOCTORAL

Gonzalo J. Delgado Pando

Madrid, octubre 2012



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria
Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de Alimentos
Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología I



Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y
Nutrición
Departamento de Productos
Laboratorio de Productos Cárnicos

DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL EN HUMANOS

Memoria que presenta Gonzalo Delgado Pando para optar al grado
de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Bajo la dirección del Dr. Francisco Jiménez Colmenero, la Dra.
Begoña Olmedilla Alonso y el Dr. Francisco José Sánchez Muniz

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y
NUTRICIÓN
(CSIC)

Madrid, octubre 2012

Francisco Jiménez Colmenero, Dr. en Ciencias Químicas y Profesor de Investigación del ICTAN, Begoña Olmedilla Alonso, Dra. en Farmacia e Investigador Científico del ICTAN y Francisco J. Sánchez Muniz, Dr. en Farmacia y Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Diseño y desarrollo de productos cárnicos con perfil lipídico optimizado. Evaluación del efecto funcional en humanos”, presentada por Gonzalo Delgado Pando para optar al grado de doctor, ha sido realizada en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del CSIC bajo su dirección, y que, hallándose concluida, autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a efectos oportunos, firmamos la presente en

Madrid, a

Dr. Francisco Jiménez Colmenero

Dra Begoña Olmedilla Alonso

Dr Francisco J.Sánchez Muniz

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del proyecto Consolider-Ingenio 2010. Productos Cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables. CARNISENUSA CSD2007-00016, dentro del subproyecto “Desarrollo de productos cárnicos funcionales (FUNCIOCA)”. Así como al proyecto AGL2008-04892-CO3-01. Plan de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I).

La presente Memoria ha sido realizada en el Departamento de Productos, Laboratorio de Productos Cárnicos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Esta tesis se ha realizado gracias a un contrato de formación de investigadores concedido a Gonzalo Delgado Pando en el marco del Proyecto Consolider-Ingenio 2010.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, el Dr. Francisco Jiménez Colmenero, la Dra. Begoña Olmedilla Alonso y el Dr. Francisco José Sánchez Muniz, por la oportunidad que me han dado para poder desarrollar este trabajo y por su implicación constante en el mismo, por la confianza depositada en mí y sobre todo por su buen hacer. En especial al Dr. Francisco Jiménez Colmenero ya que ha sido con el que más tiempo he pasado y el que más me ha tenido que aguantar. Gracias de verdad a los tres, he aprendido muchísimo de vosotros.

También quiero agradecer a los grandes profesionales de la formación que me he encontrado en la Universidad de Burgos, en donde estudié mi licenciatura y mi postgrado y en dónde adquirí la destreza y el conocimiento necesario para poder llevar a cabo esta nueva etapa de mi vida.

A D. Lluís Salva Vila por ser mi conexión con el IRTA y gestionar la burocracia con rapidez y eficacia.

A las Dras. Susana Cofrades Barbero, Ana M^a Herrero Herranz y Claudia Ruiz Capillas por su apoyo constante dentro del departamento y por su ayuda inestimable para sacar el trabajo adelante.

Al Dr. José Carballo Santaolalla por su apoyo y por ser mi primera conexión con el extinto Instituto del Frío.

A la Dra. María Teresa Solas por las imágenes de microscopía electrónica.

A Fernando, Mehdi, Lorena R. y Tati, compañeros del Instituto que me han echado una mano siempre que se la he solicitado.

A Paloma Celada, una compañera y una gran ayuda durante varios meses en la etapa final de mi contrato.

A todo el personal que ha formado parte del “laboratorio de carnes” o de otros departamentos del ICTAN (CSIC) que me han facilitado el trabajo en el centro.

Una historieta agradecida

El olor azufrado proveniente del sótano me despertó del camastro, me enfundé mi jubón y bajé con premura a la fuente de aquel desagradable olor. Por el camino abrí puertas y ventanas en un necio intento de dispersar la fetidez, pero la ausencia de viento exterior y la asfixiante temperatura no ayudaron en exceso. Llegué al lugar de los hechos, un frasco había reventado y el olor sulfúreo ascendía en forma de humo amarillento. Salí a la calle y llené un cubo de tierra que utilicé para echar sobre lo que quedaba del frasco, poco a poco la normalidad volvió a la despensa. Por suerte estaba solo en la casa y pude limpiar el desperfecto antes de que se enterara alguien, eso sí, dudaba de que el extraño olor fuera a dispersarse por completo en tan solo unas pocas horas, pero no me importó. Mis padres (*José María y Ana*) ya sabían de mi adicción por la alquimia y de mis experimentos a sus espaldas, ellos siempre me han apoyado en la decisión de adentrarme en tan enigmática materia. Además, a la mañana siguiente dejaría la ciudad y me adentraría en un viaje hacia la antigüedad y la modernidad, hacia el avance y la emancipación, o al menos eso era lo que esperaba encontrar en la parada final de este camino.

Al llegar la tarde, la casa se fue llenando, primero fue mi hermana *María*, y luego mi hermano *Yus* y mi cuñada *Ra*, todos me ayudaron un poco a arreglar aquello hasta que pasado un rato llegaron mis padres. Por las caras que pusieron al entrar, noté que sabían que alguna había liado, pero era la última noche que pasaría allí y eso pesó mucho más que cualquier “chiquillada”. Me abroché el mandil y me puse en los fogones a improvisar un plato con el que contentar a mi familia, era una cena de despedida y el mezclar alimentos, probar combinaciones y especias lo consideraba una rama más de la alquimia, y el tiempo acabó dándome la razón. Como era habitual, mi *abuela Pili* llegó para ayudar con los fogones y la preparación, atenta con todo, siempre dispuesta y siempre ahí. Con la comida ya preparada mi *abuelo Antón* hizo su aparición, viniendo a mi mente todo tipo de historietas y su afán e interés por mis experimentos. Durante la cena no pude dejar de pensar en mis otros abuelos, aquellos que ya no están, sobre todo en mi *abuela Tere*, a la que seguro le habría gustado ver el final de toda esta andanza que sí vio comenzar. La cena transcurrió, sobran los detalles ya que este no es el momento ni el lugar indicado.

Ya caída la noche, tirado sobre el colchón de paja me dio tiempo a pensar en todos los amigos que dejaba allí, aquellos a los que estaba seguro iba a volver a ver en pocos meses, ya que mi intención era la de no huir demasiado lejos y así poder volver con cierta frecuencia. Y así pasaron por mi cabeza mis días de fiesta, risas y arreglos del mundo con *Chino*, *Manu*, *Patas*, *Toño*, *Panete*, *Nuño* y *Marijuan*. También recordé a mis compañeros trovadores y sus laúdes (¡esos *Sexma!*), aunque me iba siendo parte activa de ellos, sabía que terminaría (por la distancia) viéndoles desde la platea. Con el «run-run» de alguno de nuestros estribillos me quedé totalmente adormilado y no fue hasta el canto del gallo cuando me di cuenta de que había llegado el momento.

Todo pasó rápido y el siguiente momento que recuerdo es estar a lomos de un corcel a unos cientos de pies de distancia de mi punto de partida. En ese momento mi pensamiento no estaba en mi familia ni en mis amigos, ni tampoco en la alquimia o los fogones, como en toda buena historia, las mujeres siempre están presentes. Fue por una zagala por lo que me animé a salir y la que colmaba mis pensamientos en ese y la mayoría de los momentos. Me podría enredar en unas cuantas palabras e incluso párrafos describiéndola, pero el fin de este escrito no es ni retratar ni ruborizar a nadie, por lo que simplemente os diré su nombre: *Gala*. Mi *ñamen* (que es como muchas veces cariñosamente le llamo) es una mujerzuela que apareció en mi vida poniéndola patas arriba, pero que sin embargo, tamaño desorden derivó en el orden más perfecto que jamás podría esperar.

Trotando por aquel camino tortuoso bajo la sombra de olmos y abedules y al son de picazas y otras aves, me reuní con Gala como estaba previsto. El encuentro fue más efusivo y cariñoso de lo normal, no porque hiciera unas semanas que no nos veíamos sino porque ambos sabíamos que nuestras sendas se habían unido y esperábamos llegar muy lejos a través de ellas. Los días transcurrieron con normalidad, cazando liebres, pescando en los pequeños lagos y de vez en cuando dándonos un capricho en las tabernas del camino gracias a los ahorros que nuestros padres, muy generosamente, nos habían confiado. Fue en una de éstas donde nuestra dupla se convirtió en terna, *Axel*, mujeriego famoso por aparecer en varios cantares de aventuras, se unió a nuestro camino amenizando (a veces) y sacándonos de nuestras casillas (otras) el futuro trayecto. Por suerte, solo pasaron unas semanas para que nos convirtiéramos en cuarteto, *Jullack*, el famoso viajero y viejo conocido de los tres también hizo frente común y aportó ciertas dosis de tranquilidad al viaje. Constantes fueron las riñas y peleas por los tiempos de parada, limpieza de herraduras y cocinado de estofados, pero también reconfortantes y necesarios los días y noches de risa, coloquios y alguna que otra jarra rebosante de cerveza.

En este camino pasaron muchas cosas y muchas historias, algunas interesantes y otras menos, o igual todas poco interesantes a los ojos del lector, pero como tengo licencia de autor reseñaré las que de una manera u otra me han ayudado a avanzar en mi tedioso camino. Viene a bien empezar con el encuentro de las cuatro magníficas *Desty*, *Martika*, *Shu* y *Ziortza*. «Personajas» donde las haya y aunque viejas conocidas, su formalidad cambió al juntarse todas. Durante muchos días compartimos trayectos y vocablos, siendo parte importante de ocio y apoyo.

Íbamos todos por el camino real cuando una amiga común (*Irene*) apareció y junto a ella un extraño negro animal salpicado de tonos blancos. Finalmente resultó ser el *Sr. Filotes*, un felino dormilón, asustadizo y cariñoso. Nada más verlo, Gala y yo supimos que nos acompañaría durante el resto de su vida. Adoptar a este hijo peludo con uñas afiladas y bigotes blancos, es algo de lo que más me enorgullezco de todo este trayecto. Y es una pena que no haya aprendido a leer, pero tranquilos, que de otra cosa no, pero de mimos no anda falto.

La primera parte del camino estaba llegando a su fin y las monedas comenzaban a escasear, así que era el momento de establecer un hito en el camino, o al menos, intentarlo. A lo lejos atisbaba columnas de humo y un hedor característico iba impregnando mi ropaje, tras el camino se divisaba un gran asentamiento, un final de esta primera parte del camino. Los inicios no fueron fáciles y la búsqueda de trabajo no dio sus frutos hasta unos meses más tarde. Durante ese tiempo interminable me fui aclarando las ideas de lo que quería encontrar, mis continuas salidas al bosque y los días de taberna en taberna ayudaron en la tarea. Hasta que al final vi cómo las nubes se iban y que poco a poco se fueron presentando oportunidades. Llegó la definitiva, aquella causante del trabajo que empieza después de esta historieta. Empezaría a trabajar en el gremio alquimista pero en una rama poco conocida, innovadora podría decirse, una rama que relacionaba las complejas reacciones de la alquimia con algo tan mundano como eran los alimentos. Y lentamente fui metiéndome en el mundo de la experimentación como trabajo y no como hobby.

Todo trabajo empieza por aprender y para aprender hay que observar y para observar hay que estar detrás de alguien cual perrito faldero intentando asimilar todo lo que hace, para luego ir dando cabida a las ideas propias. Y así empecé incordiando a mis primeras compañeras que me ayudaron a integrarme en el gremio: *Tati e Inés*. Tati era de mi comarca lo que facilitó el entendimiento, su actitud «independiente» me animó en los días de ocio dentro y fuera del trabajo. Inés, por otra parte, también me ayudó laboralmente, cosa de agradecer, pero siempre será mejor recordar las conversaciones pasadas y futuras entre trago y trago de un vinito joven.

Mis expectativas de futuro cambiaron por completo, ya empezaba a notar que de verdad estaba haciendo algo que siempre me había gustado y que a la larga podría servirme. Como en toda etapa nueva te rodeas de gente nueva y en los momentos de descanso y refrigerio fue donde pude desconectar y entablar más que «un hola» con los compañeros. Un jueves, o webes como diría ella, conocí a *Ailén*, que venía de tierras lejanas, aspecto reflejado en su parecido pero extraño idioma. Con la esperanza de algún día probar la cocina de su tierra, sigo teniendo contacto con ella, pero quizás deba conformarme con algo menos utópico como el que me ayude si algún día visito sus orígenes. También tengo que dejar constancia de *Tomás*, y nuestra pasión compartida por las nuevas e innovadoras obras de teatro, que han supuesto entretenimiento durante muchas horas en habla y visión. Más compañeros con los que me crucé fueron *Raquelilla* y su más que agradable sonrisa mañanera, *Isa* y su sino estrambótico y por supuesto *Marta* y *Luz* siempre enredadas en la «vaquería», pero con algunos minutillos para desvariar.

Los días de trabajo en aquella ciudad pasaban rápido y rápido también pasaban las horas libres, acomodarse a nuevas costumbres y a la emancipación lleva su tiempo, pero gracias a todos los nombrados hasta ahora y a los que luego vendrán, el camino tuvo un buen pavimento. Por este camino no puedo avanzar sin nombrar a *Elee*, *Rutty*, *Nutel* y *Luis*, que aunque conocidos someramente en alguna aventurilla pasada, en esta han aportado mucho de su tiempo y sus risas. Al estar fuera de casa en este lugar, las posibilidades de ocio se

multiplican, eso sí, como el bolsillo no lo hace en la misma medida hay que saber en qué invertir. Y no podría avanzar en mi historia sin nombrar la degustación de hidromiel con los exiliados *Pepe*, *Soto* y más tardíamente *Beni*, así como al trotamundos-cierra-tabernas ampliamente conocido como *Lyon*. Todos sabemos que pasar varios días sin pisar una taberna es perjudicial para la salud, al menos mental. Llegados a este punto también debo reseñar la afición por juegos en tablero, juegos con diversas fichas y colores, juegos de pensar, batallar y sonreír, juegos con los que socializar y cuando menos divertir. Entre los nuevos compañeros de afición y de este depurado ocio tengo que nombrar a *Matuna* y *Samu*, así como a *Dave* y su escudero hobbit *Silvia*, más reticente al juego pero engañada alguna que otra vez. Todos ellos, unidos al resto de compañeros, me han ayudado a despejar mi cabeza tirando los dados, inventando historias y conquistando las más recónditas tierras.

La gente del gremio iba y venía y los almuerzos se fueron llenando de gente variada, así conocí a muchos nuevos compañeros como *María*, *Óscar*, *al par de Beas*, *Ruth*, *Efrén* y *Javi*. Las idas y venidas también se dieron en el hogar y aparecieron en mis quehaceres cotidianos la alocada *Lucie*, la superenergética *Amelia* y la napolitana *Ile*.. En mi grupo de trabajo tuve el apoyo de gente de lejanos lugares como la pareja de *Lorenas* y *Mehdi* y pronto surgió una grata amistad con *Belén*, gracias a la nueva compañía y a los grandes ratos del pequeño pero divertido *Rincón de los Guays*, grupo selecto que amenizó los días laborables. Fue gracias al enlace de *Belén* y *Alberto*, en el que conocí a varias compañeras de *Belén* que también amenizaron mi estancia en el gremio y mi tiempo de ocio (*Fátima*, *Ione*, *Laura*, *Tamara*, *Ruth*, etc.). Sobre pasados los tiempos con el ya extinto club pasé más a focalizar mis horas de trabajo delante de libros y escritos, conociendo a *Ana* y *Nuria*, mis «escoltas» de fatiga. Mención especial merece el señor *Fer*, descuidado para las nuevas tecnologías pero siempre presente en los refrigerios y en muchas de las tardes-noches de ocio.

Sería extenso, aburrido y fuera de contexto el contar todas las peripecias de estos años lejos de mi hogar paterno, no puedo sino solamente haberos mencionado a los personajes más principales, contando poco de su papel y obviando, deliberadamente, el por qué real de su «contratación». Solo puedo continuar la historia como debe seguir la misma, que no es ni más ni menos que con el fruto del trabajo plasmado en unos cuantos cientos de líneas. Aunque sé que algunos se quedarán aquí, otros muchos me acompañarán en los siguientes capítulos, y para eso, no hace falta saber leer.

Muchísimas gracias.

A mi familia

*No intentes buscar
los recuerdos en la mochila
seguramente
lo mejor del viaje
no esté ahí guardado.
No te hace falta sino pensar
aquello que aprendiste
cuando estabas caminando*

ÍNDICE

ÍNDICE

Listado de Abreviaturas	i
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. EL PAPEL DE LA CARNE EN LA DIETA.....	3
I.1.1. Composición de la carne: micro y macro nutrientes.....	4
I.1.2. Consumo de carne y derivados en España, contribución a la dieta	5
I.1.3. Carne y salud	15
I.1.3.1. Obesidad	16
I.1.3.2. Enfermedades cardiovasculares.....	18
I.1.3.3. Cáncer.....	26
I.1.3.4. Diabetes tipo 2	29
I.2. LA CARNE EN EL ÁMBITO DE LOS ALIMENTOS «SALUDABLES»	30
I.2.1. Estrategias para la producción de carne y derivados más saludables	32
I.2.1.1. Modificación de la composición de la carne.....	32
I.2.1.2. Reformulación de derivados cárnicos	33
I.2.2. Productos cárnicos tratados por el calor. Sistemas gel/emulsión: salchichas tipo frankfurt y patés.....	34
I.2.3. Reducción/eliminación de componentes con implicaciones negativas para la salud en la reformulación de productos cárnicos	36
I.2.3.1. Grasa y energía.....	36
I.2.3.2. Colesterol	37
I.2.3.3. Sodio	38
I.2.3.4. Nitratos y nitritos.....	39
I.2.3.5. Alérgenos	39
I.2.4. Incorporación de ingredientes funcionales en la reformulación de productos cárnicos.....	40
I.2.4.1. Ácidos grasos insaturados.....	40
I.2.4.2. Proteínas, péptidos y aminoácidos	41
I.2.4.3. Probióticos.....	42
I.2.4.4. Prebióticos y fibra dietética	43

I.2.4.5. Vitaminas y antioxidantes	44
I.2.4.6. Minerales.....	45
I.2.5. Mejora del perfil lipídico en productos cárnicos. Grasas de origen vegetal y marino	46
I.2.5.1. Opciones tecnológicas para la sustitución de la grasa animal	46
I.2.5.2. Aceite de oliva	49
I.2.5.3. Aceite de linaza	50
I.2.5.4. Aceite de pescado	52
I.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL	52
I.3.1. Biomarcadores en la relación dieta-salud	53
I.3.1.1. Clasificación de biomarcadores.....	56
I.3.1.2. Biomarcadores en la enfermedad cardiovascular	56
I.3.2. Comunicación de los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales	59
I.3.2.1. Alegaciones sobre salud («Health claims»)	60
I.3.2.2. Fundamentación científica de las alegaciones sobre salud	62
II. OBJETIVOS	67
III. MATERIALES Y MÉTODOS	71
III.1. MATERIAS PRIMAS	72
III.1.1. Materia prima animal	72
III.1.2. Aceites.....	72
III.1.3. Otros ingredientes	73
III.2. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS.....	74
III.2.1. Salchichas tipo frankfurt.....	74
III.2.2. Patés	74
III.3. CARACTERIZACIÓN Y MEDIDAS DE LA ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.....	77
III.3.1. Componentes mayoritarios	77

III.3.2. Perfil de ácidos grasos.....	77
III.3.3. Propiedades ligantes de agua y grasa	78
III.3.3.1. Estabilidad de la emulsión. Pérdidas por cocción	78
III.3.3.2. Pérdidas durante el procesado	78
III.3.4. pH.....	79
III.3.5. Medida objetiva del color	79
III.3.6. Propiedades reológicas dinámicas.....	79
III.3.7. Determinación instrumental de la textura: penetrometría y TPA	80
III.3.7.1. Ensayo de penetración	80
III.3.7.2. Ensayo de Perfil de Textura Instrumental (<i>Texture Profile Analysis</i> , TPA) 80	
III.3.8. Microestructura	81
III.3.9. Oxidación lipídica.....	82
III.3.10. Determinación de nitrito residual.....	82
III.3.11. Estudio microbiológico	83
III.3.12. Determinación de aminas biógenas	83
III.3.13. Análisis sensorial.....	83
III.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL	84
III.4.1. Diseño del estudio de intervención	84
III.4.2. Selección de voluntarios	86
III.4.3. Toma de muestras biológicas, presión arterial y medidas antropométricas....	86
III.4.4. Métodos analíticos.....	87
III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	91
IV.1. DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS (SALCHICHAS TIPO FRANKFURT Y PATÉS) CON EL PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO	93
IV.1.1. <i>Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: an approach for development of functional meat products</i>	<i>95</i>
IV.1.2. <i>Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and Technological properties of low-fat frankfurters.....</i>	<i>109</i>

IV.1.3. <i>Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation.....</i>	123
IV.1.4. <i>A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté.....</i>	133
IV.1.5. <i>Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: Dynamic rheological properties and technological behaviour during chill storage.....</i>	143
IV.1.6. <i>Enriched n-3 PUFA/konjac gel low-fat pork liver pâté: lipid oxidation, microbiological properties and biogenic amine formation during chilling storage.....</i>	155
IV.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL DE LOS PRODUCTOS REFORMULADOS (SALCHICHAS TIPO FRANKFURT Y PATÉS) CON EL PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO	163
IV.2.1. <i>Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk. A placebo-controlled study.....</i>	165
V. DISCUSIÓN INTEGRADORA	195
V.1. DESARROLLO TECNOLÓGICO DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO	196
V.1.1. Desarrollo de las pre-emulsiones	197
V.1.1.1. Aspectos nutricionales	198
V.1.1.2. Aspectos tecnológicos.....	200
V.1.2. Desarrollo de los productos cárnicos.....	201
V.1.2.1. Efecto de la reducción de grasa	202
V.1.2.2. Efecto de la sustitución de la grasa animal por grasas de origen vegetal y marino	204
V.1.2.3. Efecto de la incorporación de gel de konjac	209
V.2. ASPECTOS NUTRICIONALES DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS DESARROLLADOS.....	211

V.2.1. Componentes mayoritarios.....	212
V.2.2. Perfil lipídico.....	213
V.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL.....	217
V.3.1. Marcadores e índices de ECV.....	218
V.3.2. Diseño del estudio de intervención.....	219
V.3.3. Efecto funcional de los productos.....	222
V.4. DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DE PROPIEDADES SALUDABLES...	224
VI. CONCLUSIONES.....	231
VII. REFERENCIAS.....	235
ANEXOS	277
ANEXO I.....	279
ANEXO II.....	283
ANEXO III.....	285

Listado de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGM	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGP	Ácidos Grasos Poliinsaturados
AGS	Ácidos Grasos Saturados
AICR	Instituto Americano de Investigación del Cáncer (American Institute for Cancer Research)
ALA	Ácido Alfa Linolénico (Alpha Linolenic Acid)
ANOVA	Análisis de Varianza (Anaylsis of Variance)
AOAC	Asociación de Comunidades Analíticas (Association of Analytical Communities)
APS	Aislado de Proteína de Soja
AVC	Accidentes Vasculares Cerebrales
CECU	Confederación Española de Consumidores y Usuarios
CLA	Ácido Linoleico Conjugado (Conjugated Linoleic Acid)
CS	Caseinato Sódico
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
DHA	Ácido Docosahexaenoico
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EEUU	Estados Unidos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FESNAD	Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética
FIA	Análisis de Inyección de Flujo (Flow Injection Analysis)
FOSHU	Alimentos de Uso Específico para la Salud (Foods for Specific Health Use)
FUFOSE	Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa (Functional Food Science in Europe)
HCA	Aminas Heterocíclicas (Heterocyclic Amines)
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad (High-Density Lipoproteins)
HSD	Diferencia Honestamente Significativa (Honest Significant Difference)

ICTAN	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición
IDR	Ingestas Recomendadas
ILSI	Instituto Internacional para las Ciencias de la Vida (International Life Science Institute)
IMC	Índice de Masa Corporal
IOM	Instituto de Medicina de EEUU (Institute of Medicine)
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad (Low-Density Lipoproteins)
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
MLG	Modelo Lineal General
MSSI	Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
NOCs	N-Nitrosocompuestos
O/W	Aceite en agua (Oil in Water)
PCR	Proteína C Reactiva
PHAs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
PON	Paraoxonasa
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy)
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid)
TBARS	Sustancias Reactivas con el Ácido 2-tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)
TPA	Perfil de Textura Instrumental (Texture Profile Analysis)
UCM	Universidad Complutense de Madrid
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad (Very Low-Density Lipoproteins)
WCRF	Fondo Mundial para la Investigación sobre el Cáncer (World Cancer Research Fund)
WHO	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL PAPEL DE LA CARNE EN LA DIETA

En el desarrollo de los hábitos alimentarios en la humanidad, la carne y sus derivados siempre han jugado un papel muy importante, no solo en lo concerniente a los aspectos nutricionales, sino incluso en aspectos sociales y culturales. El elevado consumo de carne puede dar una noción de cuán importante es este alimento, en el mundo la media es de 42,1 kg carne/año y persona (FAO, 2011). La diferencia en el consumo *per cápita* entre los países desarrollados (78,3 kg/año) y en vías desarrollo (32,2 kg/año) es fiel reflejo de la importancia que tiene el factor socioeconómico sobre los patrones de consumo de carne. En los últimos 20 años el consumo de carne *per cápita* en los países en vías de desarrollo ha crecido más de un 70%, mientras que en los países desarrollados apenas ha aumentado un 2%, según datos la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2011). Esta divergencia en la evolución del consumo y entre países se explica, en parte, por el precio que tiene la carne en los mercados, asociada a los costes ganaderos necesarios para la producción de la misma. Así por ejemplo, dependiendo del país, mientras que en los EEUU el valor del cerdo estaba 2749 \$/t en septiembre de 2011, en Alemania este valor fue sensiblemente inferior (2173 \$/t). Además, la evolución de los precios de la carne en los últimos diez años ha ido aumentando, alcanzándose valores un 40% superiores en la actualidad (FAO, 2011).

Una vez evidenciada la realidad socioeconómica del consumo de carne en el mundo, se puede afirmar, por volumen de consumo y dinero generado, que se trata de uno de los alimentos más importantes. Además, si se tiene cuenta que con su ingesta se obtiene un buen aporte de nutrientes (como proteínas, grasa, hierro, cinc, vitamina B₁₂, etc.) no es de extrañar que en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde la ingesta es baja, se observen carencias nutricionales entre su población. Tal es su alto valor nutritivo que en poblaciones y comunidades en riesgo, como infectados por VIH, niños y mujeres, se recomienda forme parte de la dieta para garantizar un aporte de ciertos nutrientes (FAO, 2011).

I.1.1. Composición de la carne: micro y macro nutrientes.

La carne es un alimento con un alto contenido acuoso y graso, que además aporta una gran cantidad de proteínas de alto valor biológico, ya que un 40% de sus aminoácidos son esenciales (fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina). También contiene diversos micronutrientes (como hierro, cinc, vitamina B₁₂, etc.), así como ciertos ácidos grasos esenciales. Por esto se puede aseverar que la carne y los productos cárnicos son una valiosa fuente de nutrientes esenciales (Carbajal, 2005; Ferguson, 2010).

Según el Código Alimentario Español (Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre) en el grupo de alimentos de carnes y derivados hay que diferenciar dos grandes secciones: la carne fresca (parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos sanos sacrificados en condiciones higiénicas) y la carne procesada o productos cárnicos (productos alimenticios preparados total o parcialmente con carne o despojos de especies autorizadas para tal fin). Dentro del primer grupo se encuentra un gran grupo de carnes rojas (cerdo, ternera, cordero, etc.) y otro de carnes de ave (pollo, pavo, pato, etc.) (**Figura 1**).

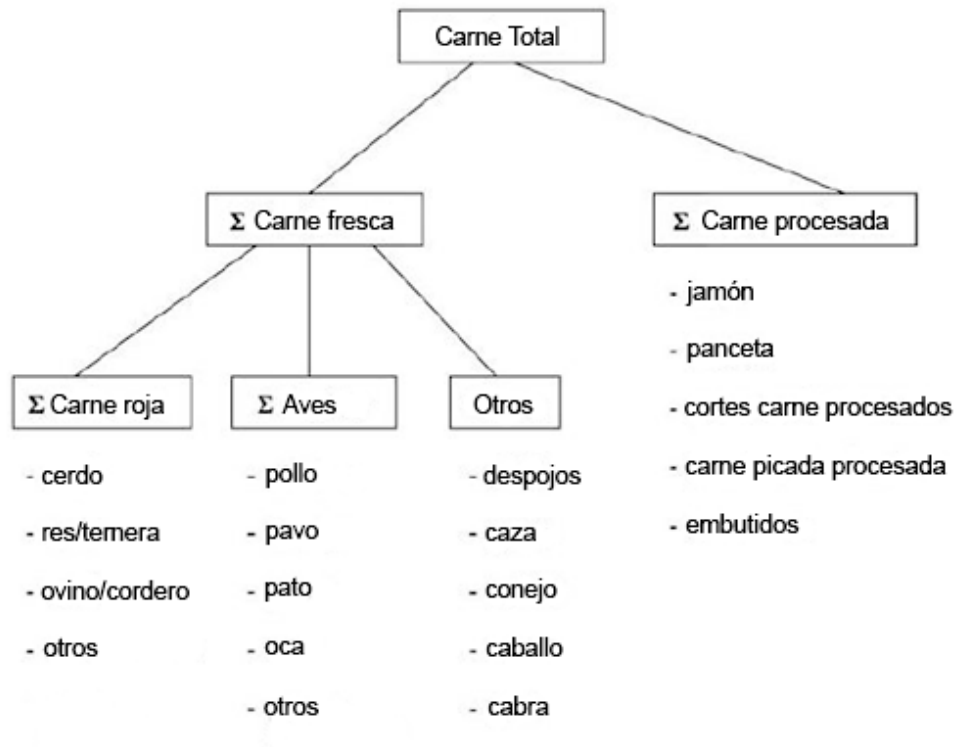


Figura 1. Clasificación principales tipos carne (Linseisen *et al.*, 2002)

Existen diferencias de composición de macro y micro nutrientes en la carne dependiendo de diversos factores entre ellos la especie, edad, la alimentación, las técnicas de muestreo y el país de procedencia.

En la **Tabla 1** se recoge la composición nutricional de los dos principales tipos de carne roja (vacuno y cerdo) en varios países. Así como la de dos productos cárnicos muy extendidos en España: salchichas tipo frankfurt y patés.

Tabla 1. Composición nutricional por 100g, de carne de vacuno, cerdo, salchichas y patés; EEUU (1), Reino Unido (2) y España (3).

	Vacuno			Cerdo			Salchichas	Patés
	1	2	3	1	2	3	3	3
Energía (kcal)	126	129	131	144	124	155	235	453
Proteína (g)	21,0	22,5	20,7	21,2	21,8	20,0	12,0	14,0
Grasa (g)	4,0	4,3	5,4	5,9	4,0	8,3	19,5	42,0
AGS	1,4	1,7	2,2	2,0	1,4	3,2	7,5	17,3
AGM	1,6	1,9	2,5	2,7	1,5	3,6	8,5	16,9
AGP	0,2	0,2	0,2	0,6	0,7	0,6	1,5	4,3
Niacina(mg)	6,2	9,7	8,1	4,8	6,9	8,7	3,0	7,1
Tiamina(mg)	0,1	0,1	0,1	1,0	1,0	0,9	0,2	0,2
Vitamina B₁₂(µg)	1,5	2,0	2,0	0,7	1,0	3,0	1,0	12,0
Hierro (mg)	1,8	2,7	2,1	0,9	0,7	1,5	1,8	5,5
Cinc (mg)	3,9	4,1	3,8	2,0	2,1	2,5	1,4	2,3
Selenio (mg)	26,0	7,0	3,0	32,4	13,0	14,0	8,3	41,6
Sodio (mg)	54,0	63,0	61,0	54,0	63,0	76,0	778,0	738,0
Potasio (mg)	323,0	350,0	350,0	384,0	380,0	370,0	180,0	173,0

Fuentes: EEUU (1) y UK (2) (Wyness *et al.*, 2011), España (3) (Moreiras, Carbajal, Cabrera, & Cuadrado, 2005)

I.1.2. Consumo de carne y derivados en España, contribución a la dieta

A través del Panel de Consumo Alimentario del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), que realiza encuestas en más de 10.000 hogares españoles, se puede conocer el consumo de carne y sus derivados en España. Este supone en España casi el 23% del gasto total destinado a alimentación, siendo el porcentaje más alto de entre todos los productos alimentarios. En 2010 el gasto total en España en carne y productos cárnicos ascendió a 15.527,8 millones de euros. En este mismo año los hogares españoles consumieron 2432,0 millones de kg de carne y productos cárnicos, lo que supuso 52,94 kg/año *per cápita* (MARM, 2010). Dentro de las distintas clases de carne, cabe destacar que el consumo de derivados cárnicos por

persona asciende hasta 12,2 kg/año. En la **Figura 2** se puede ver como la carne de pollo es la más consumida seguida de los transformados cárnicos y la carne de cerdo. Queda también reflejada la importancia de la carne roja en el consumo de carne total, suponiendo más de un tercio de la misma y a la que habría que añadir un alto porcentaje de la carne transformada, que en su mayoría proviene de carnes rojas.

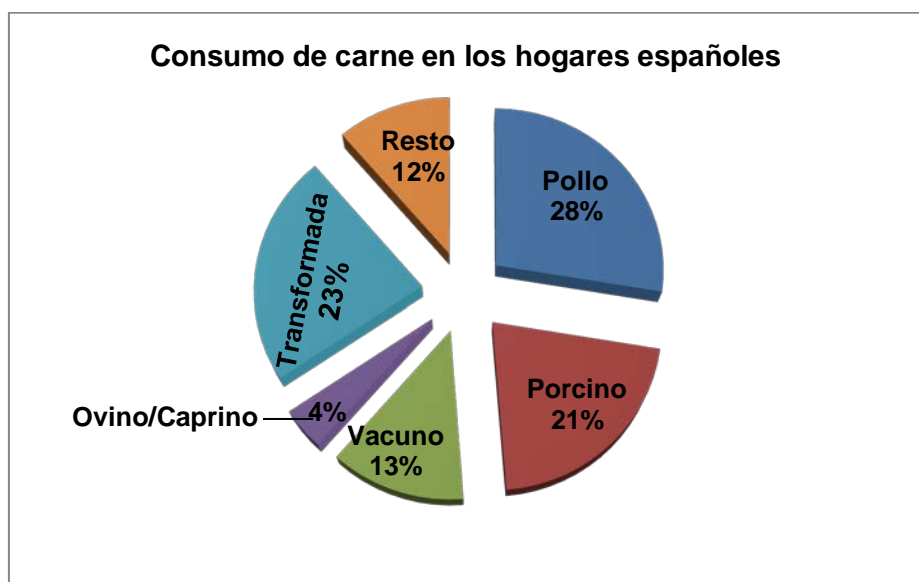


Figura 2. Consumo de los diferentes tipos de carne en España (MARM, 2010)

Si se atiende a la encuesta nacional de ingesta dietética (AESAN/MARM, 2011) cada español consume 163,84 g/día de carne y productos cárnicos. Teniendo en cuenta el consumo total (hogares y extrahogares) de carne y productos cárnicos, se puede observar la evolución a lo largo de los años (**Tabla 2**).

Tabla 2. Evolución del consumo total de carne en España. Datos Encuesta Nacional Nutrición y Alimentación (*) y MARM (g/persona/día).

	1964*	1981*	1991*	1996	2001	2006	2010
Carnes y productos cárnicos	77	179	187	173	179	179	176

Después de la leche y los cereales, la carne y sus derivados es el grupo de alimentos sólidos más consumido en nuestro país. De ahí la importancia de que se valore su implicación y contribución nutricional en la dieta habitual. Para ello, a continuación se va a analizar el aporte de energía, macro y micronutrientes que supone este consumo según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y

Nutrición (AESAN) y el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (MSSI) (MSSI/AESAN, 2012 a,b).

Energía

Los nutrientes que aportan energía al organismo son los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, pero los requerimientos energéticos se deben suministrar en mayor medida mediante el aporte de energía derivada de los hidratos de carbono y de las grasas, y en menor cantidad de las proteínas (MSSI/AESAN, 2012a). La mayor parte de los distintos tipos de carne no contienen carbohidratos, por lo que su aporte energético se debe fundamentalmente al contenido en lípidos y proteínas. La cantidad de energía que aporta la carne es variable, estando principalmente influenciada por la cantidad de grasa de la misma (Wyness *et al.*, 2011). En función del tipo y procedencia de la carne o producto cárnico, se puede encontrar una mayor o menor diferencia en su contenido energético (Tabla 1), ya que, como antes se ha comentado, su composición varía según diversos factores.

En España, el 17% del total de la energía de la dieta es aportado por la carne y los productos cárnicos (**Tabla 3**), lo que lo hace ser el grupo que más contribuye a alcanzar la ingesta energética, por encima de grupos de alimentos tan importantes como las legumbres y los cereales (MSSI/AESAN, 2012a).

Proteínas

La proteína es un macronutriente necesario para el buen funcionamiento del cuerpo humano, ya que es esencial para el crecimiento, mantenimiento y reparación de estructuras. También es fuente de energía. Cuanto más parecida es la proteína ingerida a la proteína del organismo, mayor calidad nutricional tendrá. Se define proteína de alto valor biológico (y por tanto de mayor calidad nutricional) como aquella que contiene los 8 aminoácidos esenciales, es decir, aquellos que no sintetiza el cuerpo humano. Las necesidades de ingesta de proteína son inferiores cuanto mayor es su calidad (Sánchez de Medina Contreras, 2010). La carne (y algunos productos cárnicos) constituye una de las principales fuentes de aminoácidos esenciales, además aporta histidina, aminoácido esencial en la infancia (Sánchez de Medina Contreras, 2010).

La ingesta reducida de proteína repercute en la regeneración de los tejidos. Si se ingiere proteína en exceso, esta no se almacena, sino que los aminoácidos que la componen se metabolizan en cetoácidos que pueden ser utilizados como fuente de energía o como sustrato para su transformación en hidratos de carbono o ácidos

grasos. Un exceso continuado se traduce en aumento de los niveles de nitrógeno ureico en sangre y calcio en orina (MSSI/AESAN, 2012a). El Instituto de Medicina de EEUU (Institute of Medicine, IOM) refiere algunos estudios con ingestas de proteína superiores al 35% del total de la energía sin efectos adversos (IOM, 2005), pero se ha encontrado que éstos sí aparecen cuando se supera el 45%, y que incluso pueden ser letales si son continuados en el tiempo (European Food Safety Authority, EFSA, 2011b).

Tabla 3. Perfil nutricional de la dieta española media y su relación con el consumo de carne y derivados. Adaptado de MSSI/AESAN (2012 a, b)

Nutrientes	Ingesta total/día	Nutrientes aportados por la carne	Contribución (%) de la carne a la ingesta de cada nutriente
Energía (kcal)	2293	390	17
Proteína (g)	98,68	27,6	28
Hidratos de carbono (g)	221,2	0	0
Grasa (g)	104,1	25,0	24
Ácidos grasos saturados (g)	29,2	8,5	29
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	43,6	9,2	21
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	14,1	2,3	16
Colesterol (mg)	380	64,6	17
Hierro (mg)	14,9	2,4	16
Cinc (mg)	9,6	2,5	26
Magnesio (mg)	375	33,8	9
Sodio (mg)	2526	530	21
Potasio (mg)	3951	514	13
Fósforo (mg)	1392	251	18
Selenio (µg)	58,6	9,4	16
Tiamina (mg)	1,9	0,40	21
Riboflavina (mg)	1,5	0,23	15
Eq de niacina (mg)	42,5	9,4	22
Vitamina B ₆ (mg)	1,8	0,41	23
Vitamina B ₁₂ (µg)	7,0	1,05	15
Vitamina A*(µg)	735	44,1	6
Ácido fólico (µg)	281	14,1	5
Vitamina D (µg)	4,0	0,08	2
Vitamina E (mg)	14,1	0,28	2

* Equivalentes de retinol, actividad de retinol y carotenoides

La cantidad de proteína presente en la carne y en los productos cárnicos es muy variable (p.e., 8,3 g/100 g en el tocino, 50 g/100 g en el lomo embuchado). Aún

así, la mayoría de carnes y productos cárnicos se mantienen en valores entre 10 y 20 g/100 g (Moreiras *et al.*, 2005). El consumo de carne y productos cárnicos supuso el 28% del aporte total de proteína en la dieta (Tabla 3), lo que evidencia la importancia de su introducción en la dieta para alcanzar los valores recomendados. Según esos datos se superó el 100% de las Ingestas Dietéticas de Referencia (IDR) para las proteínas, caso habitual en los países desarrollados. Según la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) el valor de referencia establecido para las proteínas es del 15% de la energía total de la dieta (SENC, 2001), en este caso se alcanzó el 17-18%, estando prácticamente toda la población por encima de estas recomendaciones (MSSI/AESAN, 2012a).

Lípidos

Los lípidos de la dieta están constituidos principalmente por triacilglicéridos, ácidos grasos unidos mediante enlaces éster a una molécula de glicerol, acompañados de cantidades mucho menores de fosfolípidos, esteroides (como el colesterol y los fitoesteroides) e isoprenoides (carotenoides, vitaminas E y K). Los lípidos además de ser la principal fuente de energía de la dieta, proporcionan ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles. En la actualidad se atribuyen a los lípidos multitud de propiedades entre las que destaca la modulación de numerosas funciones génicas y estructurales (Sánchez-Muniz, 2003; Sánchez-Muniz & Nus, 2008). La grasa en los alimentos proporciona también una mejor palatabilidad, sabor y aroma, contribuyendo a una mayor aceptación de los mismos (Sánchez-Muniz, 2005). En la actualidad es ampliamente aceptado el rol que juegan los lípidos en el posible desarrollo de enfermedades, donde ya no se trata tanto de la cantidad de grasa sino del tipo de ácido graso que es consumido (EFSA, 2010).

Los **ácidos grasos** se pueden clasificar dependiendo del número de dobles enlaces que presenten en: ácidos grasos saturados (AGS) cuando no contienen ningún doble enlace, ácidos grasos monoinsaturados (AGM) que contienen un doble enlace y ácidos grasos poliinsaturados (AGP) que contienen dos o más dobles enlaces. Dentro de los AGP hay que señalar la importancia de los AGP n-3 y n-6 (también llamados omega 3 y omega 6, respectivamente), donde su primer doble enlace se encuentra en los carbonos 3 y 4 para los AGP de la familia omega-3 y entre los carbonos 6 y 7 para los AGP de la familia omega 6, respecto al metilo terminal (Sánchez-Muniz, 2003). Este tipo de ácidos grasos cumplen funciones biológicas importantes, pero el ser humano no es capaz de catalizar la formación de dobles enlaces en las posiciones n-6 o n-3, de ahí radica su esencialidad. También hay que

hablar de los ácidos grasos *trans*, que son ácidos grasos insaturados con uno o más dobles enlaces en la configuración *trans*. Este tipo de ácidos grasos no son sintetizados por el cuerpo humano, su función biológica no es conocida, y además, su consumo elevado ha sido asociado con un incremento de enfermedades coronarias (EFSA, 2010). El término de ácido linoleico conjugado (*Conjugated Linoleic Acid*, CLA) designa una familia de isómeros naturales del ácido linoleico, cuya particularidad es que sus dos dobles enlaces no están separados por un grupo metileno sino que están conjugados. La importancia de este ácido graso radica en que se le atribuyen efectos beneficiosos al ser consumido, entre otros los relacionados con la reducción del contenido de grasa y aumento de la masa magra en humanos (Whigham, Watras, & Schoeller, 2007).

El **colesterol** es un esteroide que se encuentra en alimentos de origen animal, es un componente esencial de las membranas celulares de los mamíferos y desempeña diversas funciones vitales (Sánchez-Muniz, 2003). El colesterol no solo se obtiene de la dieta sino que el organismo puede sintetizarlo, con lo que el colesterol sanguíneo no solo viene determinado por la ingesta dietética. Altos niveles de colesterol en sangre son considerados un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV), pero cada vez más estudios revelan que no influye tanto la cantidad de colesterol total sino la fracción de las lipoproteínas que lo transportan (Sánchez-Muniz, 2003; WHO, 2009).

En la carne, la composición de ácidos grasos depende fundamentalmente de la especie animal y de su alimentación. Las especies rumiantes (vacuno, ovino, etc.) durante la digestión del rumen, convierten a la mayoría de los ácidos grasos insaturados consumidos en AGS (Lunn & Theobald, 2006). Los animales no rumiantes, como el cerdo, incorporan más fácilmente a sus tejidos los ácidos grasos de la dieta, por lo que la grasa corporal puede modificarse fácilmente mediante la alimentación (Wood *et al.*, 2004). La cantidad de AGS y AGM presentes en la carne es muy similar, varía según la especie y el corte. En la **Tabla 4** se puede observar la composición de ácidos grasos de carne de cerdo y vacuno y la de salchichas y patés. Dentro de los AGS, son el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0) los que aparecen en mayor cantidad, seguidos por el ácido mirístico (C14:0) y heptadecanoico (C17:0). El ácido oleico (C18:1 n-9) es el ácido graso más abundante de la carne y junto con el ácido palmitoleico (C16:1) y *cis*-vaccénico (C18:1 n-7) conforman los principales AGM. Es en la fracción de los AGP donde existe una mayor diferencia entre especies, si bien es cierto que en todo tipo de carne los ácidos grasos esenciales linoleico (C18:2 n-6) y alfa-linolénico (C18:3 n-3) son los mayoritarios. También aparece cierta cantidad de ácido araquidónico en patés y carne de vacuno (C20:4 n-6)

y en el caso de la carne de cerdo el ácido *cis*-11,14-eicosadienoico (C20:2 n-6). La carne también contiene ácidos grasos *trans*, la cantidad suele ser superior en los productos cárnicos que en la carne fresca y menor en las especies no rumiantes. El CLA se encuentra fundamentalmente en la carne de los rumiantes, pero la concentración de este ácido graso se ve modificada por la alimentación, por lo que cada vez se ponen más en práctica estrategias para favorecer su presencia (Pardos, Torre, & Sánchez-Muniz, 2000). La cantidad de colesterol en la carne varía según la especie y generalmente según la cantidad de grasa que posea. En el caso de los patés este nivel se ve incrementado por el uso de hígado en su producción (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil de ácidos grasos (g) y colesterol (mg) de diferentes tipos de carne y productos cárnicos (por 100 g de alimento)

	Vacuno	Cerdo	Salchichas	Paté
AGS				
C8:0	0,02	0,02	0,10	0,04
C14:0	0,12	0,07	0,37	0,35
C15:0	0,05	0,03	0,05	0,05
C16:0	0,94	1,20	5,88	5,93
C17:0	0,06	0,03	0,15	0,15
C18:0	0,53	0,60	2,96	3,03
AGM				
C16:1	0,12	0,12	0,57	0,57
C18:1	1,23	1,80	8,21	9,06
C18:1n7	0,30	0,51	2,68	2,15
C20:1	0,01	0,05	0,22	0,23
AGP				
C18:2n6	0,20	0,78	3,71	3,07
C18:3n3	0,01	0,06	0,27	0,20
C20:2n6	0,00	0,03	0,15	0,13
C20:4n6	0,01	0,03	0,06	0,05
Ácidos grasos <i>trans</i>	0,18	0,12	0,29	0,27
Colesterol	59	69	65	255

Fuente: (Moreiras *et al.*, 2005). AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados; AGP, ácidos grasos poliinsaturados

La carne y productos cárnicos aportan el 23% de la cantidad total de lípidos de la dieta, el 29% de la cantidad total de AGS, el 21% de AGM, el 16% de AGP y el 17% del colesterol (Tabla 3). Sumando la contribución energética del grupo de carne y derivados al de los aceites y grasas, se alcanza casi el 47% del aporte energético de la grasa total (MSSSI/AESAN, 2012). Según las recomendaciones nutricionales los

lípidos deberían proporcionar entre el 20% y el 35% de la energía total (%En), los AGS no deben suponer más del 10 %En, los AGP entre el 6 %En y el 11 %En y los AGM entre el 15 %En y el 20 %En dependiendo del aporte calórico total de la grasa (FAO/WHO, 2010). Atendiendo a los datos de la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética, los AGS supusieron el 12 %En, los AGM el 18 %En y los AGP el 4,7 %En (MSSI/AESAN, 2012a), por lo que solo se ajustó a los objetivos nutricionales la ingesta de AGM. La ingesta de colesterol en España estuvo entre 360 y 400 mg/día, por encima de los objetivos nutricionales intermedio y final de la SENC, 350 mg/día y 300 mg/día, respectivamente (SENC, 2001).

Vitaminas

Las vitaminas son micronutrientes esenciales para el organismo, ya que no pueden ser sintetizadas en cantidades suficientes y necesitan de su aporte mediante la alimentación. Una deficiencia en el consumo de vitaminas (hipoavitaminosis) puede inducir o acelerar el desarrollo de distintas enfermedades, pero también el exceso de algunas (hipervitaminosis) puede tener efectos perjudiciales sobre la salud (Gil, 2010).

Un importante grupo de vitaminas son las denominadas **vitaminas del grupo B**. Dentro de este grupo se encuentra la vitamina B₁ o tiamina, cuya deficiencia provoca Beri-Beri, pero en países industrializados su deficiencia está relacionada con un consumo crónico de alcohol, la riboflavina (o vitamina B₂) cuya deficiencia se precipita o exacerba con el desarrollo de otras enfermedades como el cáncer y la diabetes; la niacina cuya deficiencia desencadena la pelagra, la vitamina B₆, el ácido fólico cuya deficiencia produce anemia macrocítica y la vitamina B₁₂ cuyas deficiencias severas se asocian con anemia megaloblástica, neuropatías y acumulación de homocisteína, compuesto que en concentraciones elevadas en sangre se considera factor de riesgo de ECV (MSSI/AESAN, 2012b). La carne y los productos cárnicos son una fuente importante de vitaminas del grupo B (Tabla 3). Estos alimentos aportan el 21% de vitamina B₁, el 15% de riboflavina, el 22% de equivalentes de niacina, el 23% de vitamina B₆ y el 15% de vitamina B₁₂ del total de la dieta. La carne y los productos derivados son la principal fuente vitamina B₆ y la segunda de niacina; además, junto con el pescado y otros productos de origen animal (como huevos y leche), son la única fuente natural de vitamina B₁₂ (MSSI/AESAN, 2012b). La ausencia de carne en la dieta hace difícil alcanzar las ingestas recomendadas de este grupo de vitaminas. El contenido de folatos de este alimento está entre 3-10 µg/100 g, pero en el paté se sitúa en torno a 19 µg/100 g, ya que el hígado tiene un alto contenido de esta vitamina (192 µg/100 g). Por lo tanto, su consumo, puede contribuir a alcanzar sus ingestas recomendadas, puesto que es uno de los micronutrientes deficitarios de la dieta

española, al no superar el 80% de las IDR, quedándose entre el 59% y el 77% (MSSI/AESAN, 2012b).

La **vitamina A** preformada (retinol) se encuentra de forma natural en alimentos de origen animal (hígado, lácteos, pescado), mientras que los carotenoides, que pueden convertirse a vitamina A en el organismo, están en aceites, frutas y vegetales. La deficiencia de esta vitamina da lugar a xeroftalmia y alteraciones en epitelios y membranas. La hipervitaminosis de vitamina A puede ser crónica o aguda, pudiendo provocar desde náuseas y vómitos hasta malformaciones congénitas (MSSI/AESAN, 2012b). Pese a que la carne no aporta grandes cantidades de vitamina A (un 6% del total) (Tabla 3), al igual que ocurría con el ácido fólico, los productos cárnicos derivados a base de hígado (como el paté) pueden contener cantidades elevadas de vitamina A en forma de equivalentes de retinol. Esto es importante, ya que la ingesta de esta vitamina se considera que es insuficiente en la población española (MSSI/AESAN, 2012b), sobre todo en hombres, donde no llega al 80% de las IDR.

Las deficiencias en **vitamina E** son bastante raras y generalmente se encuentran asociadas a problemas hereditarios o metabólicos. La importancia de este micronutriente radica en su considerable potencial antioxidante. El grupo de carne y productos cárnicos no contiene una gran cantidad de vitamina E y solo aporta el 2% del total (Tabla 3), sin embargo, estas concentraciones han ido incrementándose debido al cambio en la alimentación de los animales, hasta tal punto de que algunas carnes son fuente moderada de vitamina E. Esta adición de vitamina E (en forma de tocoferol) en la alimentación animal se realiza para conseguir una reducción en la oxidación lipídica y de la hemoglobina de la carne (Lynch & Kerry, 2000).

Es importante un consumo adecuado de **vitamina D** ya que su deficiencia puede alterar el metabolismo general del hueso. Aunque a la carne no se le ha considerado una fuente importante de vitamina D, nuevos análisis que incluyen también al metabolito 25(OH)D, muestran que la carne contiene cantidades significativamente mayores que las que antes se manejaban. Además, este metabolito se absorbe mejor y más rápidamente que la vitamina D (Gil, 2010). Si el contenido en 25(OH)D no está incluido en las tablas de composición de alimentos, se puede estar subestimando la ingesta real de vitamina D (Ovesen, Brot, & Jakobsen, 2003).

Minerales

El **cinc** es un mineral que está involucrado en la regulación de la expresión génica, la síntesis de proteínas y el normal crecimiento y diferenciación celular (Gil, 2010). La biodisponibilidad del cinc es mayor en los alimentos de origen animal que en los de origen vegetal, ya que estos últimos contienen fitatos que condicionan su

absorción. La carne y productos cárnicos son el principal grupo de alimentos en cuanto al aporte de cinc, siendo responsables del 26% del aporte total de la dieta (Tabla 3). El consumo de cinc en la sociedad española es deficitario, no llegando al 80% de las IDR ni en hombre ni en mujeres (MSSI/AESAN, 2012b). En un estudio de consumo en EEUU, se observó que los no consumidores de carne de vacuno ingirieron menor cantidad de cinc en sus dietas (Nicklas, O'Neil, Zanovec, Keast, & Fulgoni, 2012) y cada vez están surgiendo mayores deficiencias de consumo de cinc en diferentes sociedades.

Una deficiencia marcada en el consumo de **hierro** genera la denominada anemia ferropénica, que es uno de los principales problemas de salud pública, ya que su prevalencia estimada en países no industrializados está por encima del 30% en todos los grupos de edad, mientras que en países industrializados dicha prevalencia se sitúa por encima del 20% en mujeres embarazadas y niños (WHO, 2001). En los alimentos de origen animal, el hierro se presenta como hierro *hemo* que se absorbe mejor que el presente en los alimentos de origen vegetal (hierro *no hemo*). El grupo de carne y derivados aportó el 16% de hierro total de la dieta (Tabla 3). En el grupo de mujeres en edad reproductiva la ingesta total de hierro no superó el 80% de las IDR, por lo que se consideró nutriente deficitario en su ingesta (MSSI/AESAN, 2012b).

Otros minerales como magnesio, sodio, potasio y selenio se encuentran en cantidad significativa en carnes y productos cárnicos (Tabla 3). El **magnesio** aportado por la carne y sus derivados supuso el 9% del total de la dieta. El 21% del **sodio** aportado por la dieta proviene del grupo de carne y productos cárnicos. Pese a que la carne es relativamente pobre en sodio, conteniendo entre 50-90 mg de sodio por 100 g (Romans, Costello, Carlson, Greaser, & Jones, 1994), los productos cárnicos, debido a que en su preparación se adiciona cloruro sódico, sí suponen un aporte elevado de sodio ya que su concentración se encuentra entre 600-1500 mg por cada 100 g (Moreiras *et al.*, 2005). Estas elevadas cantidades, que podrían resultar perjudiciales para la salud del consumidor, han llevado a la realización de numerosos estudios encaminados a la reducción de sal. El **potasio** que aportaron la carne y productos derivados fue del 13%, la ingesta total de este mineral estuvo por debajo de las IDR españolas, siendo deficiente en el grupo de mujeres de 18 a 24 años (MSSI/AESAN, 2012b). El **selenio** es un componente esencial de la enzima glutatión peroxidasa, su carencia puede provocar diferentes enfermedades como la enfermedad de Keshan, así como otras relacionadas con la función inmune, la infección viral, la reproducción y el comportamiento (EFSA, 2006). El grupo de carne y derivados aportó el 16% del selenio total.

I.1.3. Carne y salud

Se calcula que, en España, el 91% del total de las defunciones son causadas por enfermedades no transmisibles, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares y los distintos tipos de cáncer, que juntos representan el 60% del total (WHO, 2011e). Según la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), la alimentación y nutrición son factores determinantes en el desarrollo de la mayoría de estas enfermedades. En la **Figura 3** se muestran los principales factores de riesgo de mortalidad a nivel mundial agrupados según el nivel económico del país; de ellos, al menos la mitad están relacionados con la dieta.

Risk factor	Deaths (millions)	Percentage of total	Risk factor	Deaths (millions)	Percentage of total
<i>World</i>			<i>Low-income countries^a</i>		
1 High blood pressure	7.5	12.8	1 Childhood underweight	2.0	7.8
2 Tobacco use	5.1	8.7	2 High blood pressure	2.0	7.5
3 High blood glucose	3.4	5.8	3 Unsafe sex	1.7	6.6
4 Physical inactivity	3.2	5.5	4 Unsafe water, sanitation, hygiene	1.6	6.1
5 Overweight and obesity	2.8	4.8	5 High blood glucose	1.3	4.9
6 High cholesterol	2.6	4.5	6 Indoor smoke from solid fuels	1.3	4.8
7 Unsafe sex	2.4	4.0	7 Tobacco use	1.0	3.9
8 Alcohol use	2.3	3.8	8 Physical inactivity	1.0	3.8
9 Childhood underweight	2.2	3.8	9 Suboptimal breastfeeding	1.0	3.7
10 Indoor smoke from solid fuels	2.0	3.3	10 High cholesterol	0.9	3.4
<i>Middle-income countries^a</i>			<i>High-income countries^a</i>		
1 High blood pressure	4.2	17.2	1 Tobacco use	1.5	17.9
2 Tobacco use	2.6	10.8	2 High blood pressure	1.4	16.8
3 Overweight and obesity	1.6	6.7	3 Overweight and obesity	0.7	8.4
4 Physical inactivity	1.6	6.6	4 Physical inactivity	0.6	7.7
5 Alcohol use	1.6	6.4	5 High blood glucose	0.6	7.0
6 High blood glucose	1.5	6.3	6 High cholesterol	0.5	5.8
7 High cholesterol	1.3	5.2	7 Low fruit and vegetable intake	0.2	2.5
8 Low fruit and vegetable intake	0.9	3.9	8 Urban outdoor air pollution	0.2	2.5
9 Indoor smoke from solid fuels	0.7	2.8	9 Alcohol use	0.1	1.6
10 Urban outdoor air pollution	0.7	2.8	10 Occupational risks	0.1	1.1

^a Countries grouped by gross national income per capita – low income (US\$ 825 or less), high income (US\$ 10 066 or more).

Figura 3. Relación entre los diez principales factores de riesgo causantes de muerte e ingresos del país. Fuente: (WHO, 2009)

En los países desarrollados se utiliza la nutrición como estrategia para favorecer la salud y la calidad de vida, estableciéndose como objetivo la utilización de

dietas equilibradas y variadas, así como una mejora en la seguridad y salubridad de los alimentos que las componen.

La carne y los productos cárnicos están frecuentemente asociados con aspectos negativos de la salud. Como cualquier alimento, su ingesta inadecuada, en términos de cantidad, calidad y circunstancias, puede derivar en trastornos de la salud. Esto es debido a la presencia de algunos elementos que pueden resultar perjudiciales, entre los que destacan cuatro grupos de elementos (Jiménez Colmenero, Carballo, & Cofrades, 2001) :

- Presentes naturalmente en el animal (por ejemplo: la grasa, el colesterol y los residuos contaminantes)
- Añadidos durante el procesado por razones tecnológicas, microbiológicas o sensoriales (como la sal, los nitritos, los fosfatos, etc.)
- Producidos durante el tratamiento tecnológico (contaminación de bacterias o desinfectantes, compuestos tóxicos generados durante el cocinado, etc.)
- Desarrollados durante el almacenamiento y/o comercialización (productos de la oxidación lipídica, migraciones del embalaje, aminas biógenas, etc.)

Como ya se ha explicado anteriormente, aunque queda fuera de duda la importancia nutricional de la carne y de sus derivados, conviene tener en cuenta algunos de los principales problemas sanitarios asociados al consumo de estos alimentos.

I.1.3.1. Obesidad

La Organización Mundial de la Salud define el sobrepeso y la obesidad como acumulación anormal o excesiva de grasa que puede resultar perjudicial para la salud. Tanto es así que el sobrepeso y la obesidad están entre los 5 primeros factores de riesgo que más muertes causan en el mundo (Figura 3). Atendiendo al nivel económico del país, se observa que este factor sube hasta el tercer puesto en países de nivel adquisitivo medio. En los últimos años el crecimiento del número de personas obesas está aumentando alarmantemente debido a cambios en hábitos de consumo y el aumento de la inactividad. Actualmente, la obesidad y el sobrepeso causan más muertes en el mundo que la desnutrición (WHO, 2009). Este problema se verá incrementado en los próximos años, ya que se estima que 1500 millones de personas serán obesas en 2015 (WHO, 2004). En 2008 existían 1500 millones de personas mayores de 20 años con sobrepeso, más de una de cada diez personas de la población adulta mundial eran obesas (WHO, 2011d). Pero el problema no es solo de la población adulta, cerca de 43 millones de niños menores de 5 años padecen

sobrepeso. Si bien antiguamente el sobrepeso y la obesidad infantil eran propios de los países desarrollados, actualmente el problema está en claro aumento en los países en vías de desarrollo. Países, con ingresos bajos y medianos, están afrontando una doble carga de morbilidad, por una parte siguen luchando frente a enfermedades infecciosas y la desnutrición y por otra, está aumentando la obesidad y el sobrepeso en su sociedad, sobre todo en entornos urbanos; por muy raro que parezca, obesidad y desnutrición coexisten en un mismo país, comunidad e incluso hogar. Esto se explica por el menor coste y mayor accesibilidad a alimentos muy ricos en energía, grasa, sal y azúcares, pero pobres en micronutrientes (WHO, 2011d).

En España, el índice de masa corporal (IMC) promedio (utilizado para medir el grado de obesidad), ha aumentado en más de dos puntos en los últimos 25 años, de los 25,5 kg/m² hasta los casi 28 kg/m² (WHO, 2011e). La problemática de la obesidad afecta al 54,3% de la población española, que posee un IMC > 25 kg/m², frente al 1,8% que tiene un IMC por debajo de 20 kg/m² (el intervalo normal se sitúa entre 20 y 24,9 kg/m²) (WHO, 2007). El riesgo de padecer enfermedad coronaria, accidente isquémico cerebrovascular, diabetes tipo 2 y algunos cánceres (pecho, colon y próstata entre otros), aumenta con el IMC. A nivel mundial, las causas que son atribuibles al sobrepeso y obesidad ascienden hasta el 44% en desarrollo de la diabetes, al 23% en las enfermedades cerebrovasculares y entre el 7-41% en determinados cánceres (WHO, 2009).

Aunque la etiología y el desarrollo de la enfermedad responden a diversos factores de cierta complejidad, la causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas. Este desequilibrio se debe fundamentalmente a dos factores: el aumento del consumo de alimentos hipercalóricos y la disminución de la actividad física como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria. Estos cambios en los modelos y hábitos alimentarios y de actividad física se deben al creciente desarrollo de la sociedad, en la cual prima la comodidad y el ahorro de tiempo sobre la salud. Esto, unido a la falta de políticas de apoyo en sectores como salud, agricultura, transporte, comercialización y distribución de alimentos y educación (entre otros), hacen que el desarrollo de la obesidad y el sobrepeso cada vez sea mayor (WHO, 2011e).

El papel de la carne y los productos cárnicos en el desarrollo de sobrepeso y obesidad es muy controvertido. Existen diversos estudios que muestran que personas vegetarianas tienden a tener un IMC inferior a las no vegetarianas. Sin embargo, este resultado puede no deberse exclusivamente a la dieta sino también a estilos de vida más saludables (Wyness *et al.*, 2011). La carne, pero sobre todo los productos

cárnicos, son considerados alimentos calóricos debido fundamentalmente a su elevado contenido en grasa. Si bien dentro de la carne existen importantes diferencias cuantitativas (según la raza y el corte), muchos de los productos cárnicos tradicionales sí poseen un alto contenido energético. Como contraprestación a este aporte calórico y relacionado con la alta cantidad de proteína que estos productos presentan, diversos estudios han determinado que dietas ricas en proteína pueden ejercer un efecto saciante, facilitando así una pérdida o mantenimiento del peso corporal (Halton & Hu, 2004; Layman, Clifton, Gannon, Krauss, & Nuttall, 2008; Paddon-Jones *et al.*, 2008). Hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado en el apartado anterior, que la eliminación de la carne y los productos cárnicos de la dieta puede acarrear un grave problema nutricional, debido a la calidad de las proteínas, así como a los ácidos grasos esenciales y diversos micronutrientes que aporta. Sin embargo, un exceso de la misma también puede llevar aparejado aspectos negativos (Carbajal, 2005).

I.1.3.2. Enfermedades cardiovasculares

Se denominan enfermedades cardiovasculares (ECV) a aquellas que afectan a los vasos sanguíneos y/o al corazón, y estas son: cardiopatías: coronarias, reumáticas y congénitas; arteriopatías periféricas; enfermedades cerebrovasculares, entre las que se encuentran los accidentes vasculares cerebrales (AVC) y trombosis venosas profundas y embolias pulmonares.

La importancia de las ECV radica en que son la principal causa de muerte a nivel mundial, cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que un 30% de todas las defunciones de 2004 fueron por ECV, siendo un 24% de las mismas cardiopatías coronarias y un 20% AVC (WHO, 2011a). El 33% de las muertes producidas en España se deben a ECV (WHO, 2011e). La WHO prevé que en 2030 morirán 23,6 millones de personas por ECV, manteniéndose ésta como la principal causa. El 80% de las muertes por ECV se produce en los países de ingresos bajos y medianos, suponiendo un grave problema tanto desde el punto de vista económico (familias con un miembro aquejado de ECV pueden verse obligadas a destinar el 30% de sus ingresos o más para tratar la enfermedad) como social (afecta a más jóvenes en edad de trabajar por ECV debido al difícil acceso sanitario eficaz) (WHO, 2011a).

Ocho factores de riesgo son los responsables del 61% de la aparición de ECV y suponen el 61% de las muertes causadas por ECV, éstos factores son: consumo de alcohol, consumo de tabaco, presión arterial elevada, IMC elevado, nivel de colesterol en sangre elevado, nivel de glucosa en sangre elevado, baja ingesta de frutas y

verduras, e inactividad física (WHO, 2009); todos ellos son «factores de riesgo modificables» ya que dependen del comportamiento humano: dieta poco saludable, inactividad física y consumo de tabaco. El resto se consideran «factores de riesgo intermedios» ya que pueden surgir como manifestaciones de una dieta poco saludable e inactividad física. El 80% de las cardiopatías y enfermedades cerebrovasculares se producen por los factores de riesgo modificables (WHO, 2011c). En España, según prevalencias estimadas para 2008, el 25.9% de los españoles eran fumadores y la prevalencia de la inactividad física fue del 52.1%. Atendiendo a la tendencia (en los últimos 28 años) de los factores de riesgo metabólicos (los denominados anteriormente intermedios) para ECV, la única clara tendencia a la baja es en el nivel de colesterol en sangre y la tensión arterial sistólica (TAS) en mujeres. La presión arterial promedio en hombres se ha estancado e incluso aumentado ligeramente en los últimos cinco años. Además del ya comentado aumento del IMC, se observa un aumento generalizado del nivel de glucosa en sangre, casi 0.3 mmol/l en los últimos 3 años (WHO, 2011e).

A pesar de contener diversos nutrientes potencialmente protectores (como por ejemplo selenio, vitaminas del grupo B, ácidos grasos n-3), diversos estudios asocian a la carne y sus derivados con un aumento en el riesgo de padecer ECV (Ashaye, Gaziano, & Djousse, 2011; Kelemen, Kushi, Jacobs, & Cerhan, 2005; Kontogianni, Panagiotakos, Pitsavos, Chrysohooou, & Stefanadis, 2008; Sinha, Cross, Graubard, Leitzmann, & Schatzkin, 2009; Steffen *et al.*, 2005). Debido a la dificultad para determinar con exactitud la ingesta de alimentos o nutrientes y el hecho de que los individuos eligen alimentos (y combinaciones) y no nutrientes aislados, ha llevado a los científicos a usar análisis de patrones alimentarios más que alimentos aislados a la hora de determinar riesgos de ECV (Wyness *et al.*, 2011). Así pues, existen estudios en los que se demuestra que personas vegetarianas tienden a tener menores niveles de factores de riesgo cardiovascular (Teixeira, Molina, Zandonade, & Mill, 2007); también se ha analizado el consumo de carne dentro de una dieta occidentalizada (con alto consumo de carne roja, derivados cárnicos, azúcares refinados, dulces, etc.) y muchos de los resultados sugieren que el riesgo de ECV se ve aumentado con el consumo de esta dieta occidental (Fung, Willett, Stampfer, Manson, & Hu, 2001; Heidemann, Scheidt-Nave, Richter, & Mensink, 2011; Heidemann *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2000; Panagiotakos *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios no han encontrado tal relación (Guallar-Castillón *et al.*, 2010; Harriss *et al.*, 2007). La dificultad de estos tipos de análisis radica en que es muy complejo aislar el papel que tiene la carne, a lo que hay que añadir que la carne procesada y la carne como tal están dentro del mismo

patrón dietético. Un metaanálisis de ocho estudios de cohortes no encontró coherencia en la causalidad del consumo de carne frente al riesgo de padecer enfermedades coronarias (Mente, de Koning, Shannon, & Anand, 2009).

El tipo y cantidad de grasa de la carne, así como también el contenido de sodio en el caso de los productos cárnicos, son los principales componentes de carne y derivados que consumidos en cantidades no adecuadas se asocian con el aumento del riesgo cardiovascular, como se describe más adelante.

Tipo de grasa y ECV

En el caso de los lípidos la relación lípidos-ECV se debe al poder calórico de los mismos (discutido en el apartado carne y obesidad) y a la relación del metabolismo de las lipoproteínas, encargadas de transportar los lípidos a los tejidos, con los niveles de colesterol sanguíneo (Gil, 2010; Sánchez-Muniz, 2003)

Metabolismo de las lipoproteínas

Las lipoproteínas son las partículas encargadas de transportar a los lípidos en la sangre. Existen diferentes tipos de lipoproteínas agrupadas en función de su densidad, así de menor a mayor densidad hay cuatro grupos principales: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoproteins*, VLDL), lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoproteins*, LDL) y lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoproteins*, HDL) (Gotto, Pownall, & Havel, 1986). Tanto quilomicrones como VLDL son lipoproteínas relativamente grandes y transportan principalmente triglicéridos, los primeros transportan esencialmente triacilglicerol exógenos y las VLDL triglicéridos de origen endógeno. Las LDL son las encargadas de transportar la mayoría del colesterol esterificado, el cual supone dos tercios del colesterol circulante. Las HDL son las más pequeñas y tienen un contenido elevado en apoproteínas, transportan fundamentalmente colesterol esterificado y fosfolípidos por igual. Por lo tanto, las más importantes en relación con las ECV son las LDL y las HDL ya que son las encargadas de transportar la mayoría del colesterol entre el hígado y las células corporales.

Las LDL son captadas en su mayoría por el hígado gracias al receptor de LDL, este receptor se regula mediante el colesterol celular, cuando el nivel de colesterol es alto, él mismo inhibe su síntesis endógena. Pero existe otro receptor que es el receptor *scavenger* o receptor de LDL modificadas (S-R o SRA) que reconoce a las LDL modificadas por acetilación u oxidación, este receptor, sin embargo, no se regula por el colesterol intracelular. Debido a este hecho, la concentración en sangre de colesterol puede ser elevada y sin embargo seguir acumulándose hasta formar células

espumosas que posteriormente juegan un papel fundamental en el desarrollo de las placas de ateroma (Goldstein, Ho, Basu, & Brown, 1979)

Las HDL transfieren ésteres de colesterol a otras lipoproteínas (principalmente quilomicrones y VLDL), cuando son maduras son identificadas por receptores hepáticos y son integradas. Este proceso constituye la vía más eficaz de recogida de colesterol periférico y transporte hasta el hígado, lo que se denomina transporte reverso del colesterol y explica la capacidad antiaterogénica de las HDL (Tall, 1998). A su vez, las HDL disponen de un sistema antioxidante muy eficaz, conocido como paraoxonasa (PON) que limita la oxidación de las LDL y de otras lipoproteínas (Canales & Sanchez-Muniz, 2003)

Por lo tanto el riesgo de ECV se ve aumentado con un nivel sanguíneo alto de LDL-colesterol y bajo de HDL-colesterol, mientras que si la situación es la inversa (alto nivel HDL-colesterol y bajo de LDL-colesterol) el efecto es protector y se reduce el riesgo de ECV.

Ácidos grasos saturados y ECV

Desde hace bastante tiempo se ha establecido que los AGS de la dieta incrementan la concentración total de colesterol, tanto de la fracción LDL como, a veces, de la HDL (Cuesta, Ródenas, Merinero, Rodríguez-Gil, & Sánchez-Muniz, 1998; Hegsted, McGandy, Myers, & Stare, 1965; Keys & Parlin, 1966). Pero diversos estudios de laboratorio han demostrado que también influye el tipo de ácido graso que componga esa grasa saturada, así pues, los ácidos láurico, mirístico y palmítico se han asociado con un aumento de valores de colesterol total y LDL-colesterol (Kris-Etherton & Yu, 1997; Temme, Mensink, & Hornstra, 1996). Respecto al ácido esteárico si bien no incrementa los valores de LDL-colesterol, algunos autores sí han descrito un efecto en cuanto a una posible disminución de HDL-colesterol, aún así, tanto el ácido esteárico como los ácidos grasos de cadena corta (menos de diez átomos de carbono) son considerados neutros frente al metabolismo lipídico (Bonanome & Grundy, 1988; Kris-Etherton & Yu, 1997; Yu, Derr, Etherton, & Krisetherton, 1995). Para estos cuatro AGS se ha observado una asociación positiva con el índice de muerte por ECV en datos del «estudio de los Siete Países» (Kromhout *et al.*, 1995), análisis más recientes confirman dicha asociación (Aspelund *et al.*, 2010). Sin embargo, un meta-análisis llevado a cabo en los últimos años ha determinado que no existe asociación entre el consumo de AGS y el riesgo de ECV (Siri-Tarino, Sun, Hu, & Krauss, 2010), estudio que ha sido duramente criticado por su metodología e interpretación (Katan, Brouwer, Clarke, Geleijnse, & Mensink, 2010; Kromhout, Geleijnse, Menotti, & Jacobs, 2011;

Pedersen *et al.*, 2011). Últimamente se ha puesto en evidencia el efecto de los AGS sobre la ECV, ya que se argumenta que un consumo moderado o limitado de AGS implica un aumento en el consumo de otra fuente de energía (Bhupathiraju & Tucker, 2011). Existen diversos ensayos que concluyen que no es lo mismo una sustitución de los AGS por AGM, que por AGP o carbohidratos. En concreto, Astrup *et al.* (2011) tras revisar diversos análisis sobre el tema, llegan a la conclusión de que hay claros indicios de que la sustitución de AGS por AGP reduce la incidencia de ECV; sin embargo, la relación no es clara cuando se sustituyen AGS por AGM; tampoco se observa reducción de riesgo de ECV cuando la sustitución es por carbohidratos, si bien es cierto que debería existir una reducción si los carbohidratos fueran de índice glucémico bajo y no estuvieran refinados, los autores estiman necesarios más estudios al respecto. Los mismos autores resaltan la complejidad de establecer una relación estrecha entre AGS y ECV apoyándose solo en un biomarcador, así como el error que supone atribuir a los AGS el aumento de riesgo de ECV en determinados alimentos, ya que contienen otros componentes que también podrían influir negativamente.

Existen diferentes factores capaces de provocar una variación en los niveles de colesterol en sangre asociados a la ingesta de AGS: el IMC, la edad, el sexo, si existe menopausia, los niveles basales de LDL-colesterol o las características genotípicas de cada individuo (Palou *et al.*, 2008).

Ácidos grasos monoinsaturados y ECV

A raíz de los efectos beneficiosos observados en la denominada Dieta Mediterránea, en la que el aceite de oliva (rico en ácido oleico) es uno de sus principales componentes, se ha puesto mucho interés en el estudio de los AGM. Una sustitución de los AGS por AGM disminuye la concentración de colesterol total y LDL-colesterol, pero en cuanto al HDL-colesterol no está claro si no afectan a su concentración o producen una ligera disminución (Gardner & Kraemer, 1995). Sin embargo, la ventaja de los AGM frente a los AGP radica en la menor susceptibilidad para ser oxidados, ya que solo poseen un doble enlace. Este hecho podría trasladarse a la oxidación de las LDL, donde existen importantes evidencias de que los AGP aumentan la posibilidad de oxidación de las LDL comparados con los AGM (Bhupathiraju & Tucker, 2011; Palou *et al.*, 2008). Como ya se ha descrito, las LDL oxidadas inducen la formación de placas de ateroma que llevan al desarrollo de las ECV.

Hasta la fecha no existen estudios controlados aleatorios en humanos (considerados los mejores indicadores) en los que el resultado clínico final sea la morbilidad o mortalidad por ECV relacionada con el consumo de AGM, ya sea

favoreciendo o disminuyendo el riesgo (Gillingham, Harris-Janz, & Jones, 2011). Atendiendo a los datos epidemiológicos respecto a la protección de los AGM frente al riesgo de padecer ECV, en la mayoría se encuentra un efecto protector, si bien no en todos (Bhupathiraju & Tucker, 2011). Analizando 507 estudios observacionales (prospectivos de cohortes), Mente *et al.* (2009) confirmaron la fuerte relación entre la «Dieta Mediterránea» y la reducción del riesgo de padecer ECV. Estos autores también encontraron una reducción del riesgo de ECV, aunque en menor grado, con el consumo de AGM.

Ácidos grasos poliinsaturados y ECV

Al igual que ocurría con los AGS, dependiendo del tipo de ácido graso el efecto biológico que genera su consumo varía. Existen dos principales grupos de AGP, los n-3 y los n-6.

AGP n-6

Cuando este tipo de ácidos grasos se suministra en lugar de los AGS se observa un descenso en el nivel de colesterol total y de LDL-colesterol (Gardner & Kraemer, 1995; Kris-Etherton & Yu, 1997). Sobre los niveles de HDL-colesterol un meta-análisis llevado a cabo por Mensink, Zock *et al.* (2003) concluyó que sustituyendo un 1% de energía de carbohidratos por AGP n-6, los niveles de HDL-colesterol se elevaban ligeramente. Pero también existen estudios que obtuvieron una reducción de los niveles de HDL-colesterol al reemplazar AGS por AGP n-6, de ahí que a veces se haya recomendado preferencialmente a los AGM sobre los n-6 AGP (Gardner & Kraemer, 1995; Lunn & Theobald, 2006). Dentro de este grupo de ácidos grasos se encuentra el ácido linoleico que produce un efecto reductor en el colesterol total y LDL-colesterol (Hegsted *et al.*, 1965), pero también es importante el efecto que se le atribuye de minimizar la acción hipercolesterolemizante de los AGS (Palou *et al.*, 2008). Existen pocos estudios acerca de la relación directa de los AGP n-6 con el desarrollo de ECV, hay pocas investigaciones y la mayoría data de las décadas de los años 60 y 70 del pasado siglo, y éstas son contradictorias, ya que mientras unos resultados afirman una protección otros no encuentran relación alguna (Lunn & Theobald, 2006) y otros señalan aspectos negativos cuando se consumen en gran cantidad (Mata *et al.*, 1996).

AGP n-3

Una dieta rica en AGP n-3 de cadena larga, como la estudiada en los esquimales de Groenlandia a mediados de los años 70, se relacionó con los bajos niveles de cardiopatía isquémica (Bhupathiraju & Tucker, 2011). A partir de entonces se ha venido investigando sobre los efectos beneficiosos de este tipo de ácidos grasos. Principalmente en este grupo se encuentran el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5, n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6, n-3). Suplementaciones con AGP n-3 de cadena muy larga (EPA+DHA) parecen no influir en el nivel de colesterol total, aunque sí existe una tendencia (no significativa) al aumento tanto de HDL- como de LDL-colesterol (Lunn & Theobald, 2006). Cuando se atiende a estudios monoterapéuticos, en los que se usa EPA o DHA, se ha encontrado que el DHA aumenta significativamente los niveles de LDL-colesterol, mientras que existe una disminución no significativa de LDL-colesterol por efecto del EPA (Wei & Jacobson, 2011). Sin embargo, no existe consenso al respecto y sí en que ambos reducen el nivel de triglicéridos (Lunn & Theobald, 2006). De hecho, no existe ningún componente de la dieta que reduzca en mayor cuantía los triglicéridos que los AGP omega-3 (Harris, 1997). Lo que realmente le atribuye a estos ácidos grasos su capacidad cardioprotectora, además de la reducción de triglicéridos, son los efectos antiarrítmicos y de mejora de la función endotelial vascular, que provocan un descenso de la presión arterial y de la agregación plaquetaria (Wijendran & Hayes, 2004). Sin embargo, recientemente, Mente *et al.* (2009) mediante un meta-análisis no observaron un efecto protector de los AGP n-3 de origen marino, rico en EPA y DHA, sobre el riesgo de enfermedades coronarias, aunque sí apreciaron una cierta protección relacionada con el consumo de pescado.

Otro AGP n-3 importante es el ácido alfa-linolénico (ALA), ácido graso esencial de origen vegetal, que no puede ser sintetizado por el cuerpo humano y que se ha propuesto como alternativa a EPA y DHA ya que pueden sintetizarse a partir de él de una manera muy limitada (Bhupathiraju & Tucker, 2011). Este ácido graso actúa de manera similar al ácido linoleico respecto a las lipoproteínas, reduciendo los niveles de colesterol total y LDL-colesterol sin ejercer efectos significativos sobre el HDL-colesterol (Lunn & Theobald, 2006). Las evidencias científicas respecto a la acción beneficiosa de este ácido graso frente al desarrollo de ECV no son consistentes. Un meta-análisis de 5 estudios prospectivos concluyó que una ingesta elevada de este ácido graso estaba asociada con una reducción no significativa (del 21%) del riesgo de contraer cardiopatías mortales, pero también incrementaba el riesgo de padecer cáncer de próstata (Brouwer, Katan, & Zock, 2004). Otro meta-análisis concluyó la no protección del ácido alfa linolénico frente al desarrollo de cardiopatías (Mente *et al.*,

2009). Olmedilla-Alonso *et al.*, (2006) y Canales *et al.* (2009; 2007) han mostrado que el consumo regular de carne con nueces reduce de forma efectiva los niveles de colesterol y la trombogénesis e incrementa el estatus antioxidante en voluntarios con riesgo cardiovascular elevado. Dichos efectos son atribuibles, al menos parcialmente, al alto contenido en alfa-linolénico de las nueces.

Ácidos grasos trans, CLA, colesterol y ECV

Estudios epidemiológicos y experimentales demuestran una relación directa entre el consumo de ácidos grasos *trans* y el riesgo de padecer ECV (Hu, Manson, & Willett, 2001; Kromhout *et al.*, 1995; Mente *et al.*, 2009). Estos ácidos grasos no solo provocan un aumento del LDL-colesterol y de los triglicéridos, sino también una disminución del HDL-colesterol (Katan, Zock, & Mensink, 1995; Kris-Etherton & Yu, 1997).

Se han descrito efectos potencialmente saludables del CLA en diversos sistemas biológicos, entre los que relacionados con el desarrollo de ECV se encuentran propiedades antiadipogénicas y antiaterogénicas (Bhattacharya, Banu, Rahman, Causey, & Fernandes, 2006).

La ingesta de colesterol dietético supone un aumento del nivel de lipoproteínas, tanto de LDL como de HDL, esto hace que el ratio LDL/HDL (muchas veces utilizado como marcador de riesgo) permanezca prácticamente inalterado (McNamara, 2000). Resulta difícil establecer el papel del colesterol en el desarrollo de ECV ya que su consumo se encuentra directamente relacionado con el de AGS e inversamente con el consumo de pescado y fibra. Pero realizando un análisis concienzudo de los estudios epidemiológicos (teniendo en cuenta la colinearidad colesterol-AGS) no se encuentra relación entre la ingesta de colesterol dietético y el desarrollo de ECV, ya que la mayoría de los individuos pueden adaptarse a una ingesta elevada de colesterol (Kratz, 2005; McNamara, 2000). Sin embargo puede producirse un descenso en el riesgo de ECV en individuos especialmente sensibles en respuesta a cambios en el nivel de colesterol dietético con una reducción de su consumo (Kratz, 2005).

Sodio y ECV

Como ya se ha señalado con anterioridad la presión arterial es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de ECV, pero también es el factor de riesgo principal en la mortalidad mundial (WHO, 2009). El 45% de los infartos de miocardio y el 50% de los ictus cerebrales se deben a la hipertensión arterial, cuya principal causa

es el consumo excesivo de sal (**Figura 4**) (MSPS/AESAN, 2010). El mecanismo más aceptado del efecto del sodio sobre la hipertensión se basa en la incapacidad del riñón para eliminar el sodio ingerido en exceso, lo que se traduce con un aumento de la presión arterial. Por ello, es ampliamente recomendado un bajo consumo de sodio en personas con riesgo de hipertensión y como complemento a la medicación hipertensiva (Kotchen & McCarron, 1998). Existe una clara asociación entre el consumo de carne procesada e hipertensión, debido fundamentalmente a sus niveles de sodio y posiblemente al uso de sustancias nitrificantes en su procesado (Micha, Wallace, & Mozaffarian, 2010; Paik, Wendel, & Freeman, 2005).

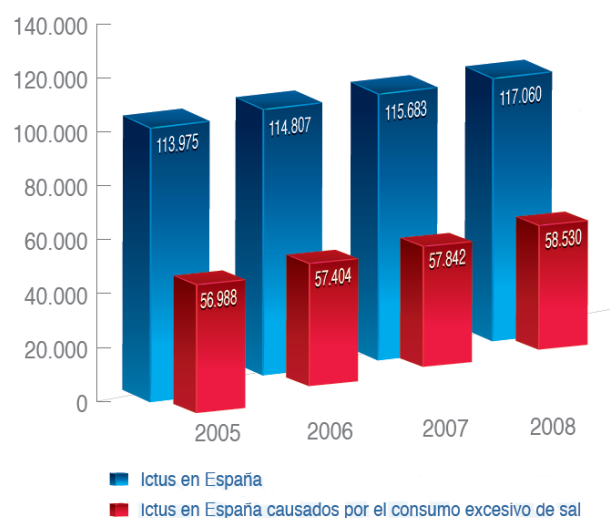


Figura 4. Consumo de cloruro sódico e ictus en España (MSPS/AESAN, 2010)

I.1.3.3. Cáncer

En España, el 27% de las muertes por enfermedades no transmisibles ocurren a causa del desarrollo de algunos tipos de cáncer (WHO, 2011e). Existen numerosos estudios que han analizado la relación entre estilos de vida (incluida la dieta), factores ambientales y el riesgo de padecer cáncer (Wyness *et al.*, 2011). El Fondo Mundial para la Investigación sobre el Cáncer (*World Cancer Research Fund*, WCRF) junto con el Instituto Americano de Investigación del Cáncer (*American Institute for Cancer Research*, AICR) llevan estudiando desde hace varios años la influencia de la dieta en la prevención del cáncer. En 2007 presentaron un segundo informe (el primero data de 1997) detallando las evidencias científicas encontradas hasta el momento sobre el papel de los alimentos, la nutrición y la actividad física en la prevención del cáncer. En relación con la carne y productos cárnicos, este estudio propone una reducción de la

ingesta de carnes rojas hasta un máximo de 500 g por semana y un consumo mínimo o nulo de carnes procesadas (aquellas saladas, curadas o ahumadas, o a las que se haya añadido conservantes químicos), ya que han encontrado que su consumo elevado aumenta el riesgo de padecer cáncer colorrectal y posiblemente otros tipos de cánceres (WCRF/AICR, 2007). Para llegar a esta conclusión se han basado en diferentes estudios prospectivos, la mayoría recopilados en tres meta-análisis (Larsson & Wolk, 2006; Norat, Lukanova, Ferrari, & Riboli, 2002; Sandhu, White, & McPherson, 2001). Un reciente informe del WCRF/AICR insiste en la asociación positiva entre el consumo de carne roja y procesada y el riesgo de padecer cáncer de recto y colon, aunque con un riesgo relativo algo menor al del informe global (WCRF/AICR, 2010). En consonancia con estos resultados, meta-análisis recientes respaldan la misma asociación (Chan *et al.*, 2011; Huxley *et al.*, 2009). No obstante, existe un amplio debate al respecto ya que diversos autores argumentan que muchas evidencias son inconsistentes, lo que impide realizar categóricamente dicha asociación (Ferguson, 2010; McAfee *et al.*, 2010; Wyness *et al.*, 2011). Es más, recientes revisiones descartan, que con la evidencia actual, se pueda asegurar que exista una relación positiva entre el consumo de carne roja y el riesgo de padecer cáncer colorrectal (Alexander, Weed, Cushing, & Lowe, 2011; Spencer *et al.*, 2011). Parece, por lo tanto, que existe cierta dificultad a la hora de establecer dicha relación y que la comparación entre estudios es controvertida, ya que existen infinidad de variables que difieren de un estudio a otro. Términos como a qué se le considera carne roja y a qué carne procesada, varían de unos estudios a otros; la precisión con la que se registra el consumo de carne es muy pequeña ya que el cocinado, tiempo de preparación y contenido en grasa es variable, así como el método de recogida de datos; la dificultad en separar el efecto de los componentes y el de los propios alimentos es otro factor a tener en cuenta, ya que muchas veces es el patrón dietético el que marca la asociación (Boyle, Boffetta, & Autier, 2008; Ferguson, 2010; McAfee *et al.*, 2010; Wyness *et al.*, 2011).

Existen diversos estudios respecto al papel de la carne roja y carnes procesadas en otros tipos de cánceres como de esófago, estómago, pulmón, páncreas y endometrio, las evidencias científicas que pueden llegar a relacionarlos son limitadas (WCRF/AICR, 2007). Quizás más controvertidas son las evidencias que relacionan el consumo de carne roja con el cáncer de mama, en las que de momento se han encontrado ligeras asociaciones positivas pero no significativas (Alexander, Morimoto, Mink, & Cushing, 2010).

La supuesta capacidad carcinogénica de la carne se asocia en su mayoría a varios factores: tipo de carne (roja o procesada), método de cocinado, cantidad consumida y riesgos genéticos individuales (Larsson & Wolk, 2006). Los posibles mecanismos que relacionan el desarrollo de cáncer (la mayoría estudiados en cáncer colorrectal) y el consumo de carne roja y procesada, se basan en la composición, el procesamiento y el uso de algunos aditivos alimentarios. Un claro establecimiento de estos mecanismos permitiría reducir los casos de cáncer sin tener que restringir el consumo de carne roja y procesada, simplemente cambiando la metodología de procesamiento (Ferguson, 2010). Algunos de los posibles mecanismos se detallan a continuación.

Una de las hipótesis propuestas es que las dietas con un **contenido alto en grasa** promueven la aparición de cáncer. El tipo de grasa también ha sido considerado en esta hipótesis, pero no existen evidencias suficientes que relacionen ninguno de los dos conceptos. Sin embargo, un aspecto que sí podría estar asociado es la alta densidad energética que poseen algunos productos cárnicos de alto contenido en grasa, ya que existen algunas evidencias que relacionan la obesidad con determinados tipos de cáncer (Ferguson, 2010).

El mecanismo más convincente que vincula la carne y el desarrollo de cáncer colorrectal, implica a diversos componentes mutagénicos formados durante el cocinado de la carne a altas temperaturas, como son las **aminas heterocíclicas (heterocyclic amines, HCAs)**, los **hidrocarburos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)** y los **N-nitrosocompuestos (NOCs)** (Alaejos, Gonzalez, & Afonso, 2008; Cross & Sinha, 2004). Respecto a las HACs es complicado establecer la relación, ya que las cantidades que se han encontrado como carcinogénicas en animales, son muy superiores a las que puedan llegar a consumirse por la fritura de carne, incluso para la carne de pollo frita, que es la que más HACs aporta, su consumo no ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer (Williamson, Foster, Stanner, & Buttriss, 2005). Los PAHs en la carne se generan al cocinarse ésta sobre una llama, pero las evidencias que los relacionan con el cáncer de colon son aún más débiles (Cross & Sinha, 2004). Los NOCs se forman por reacción del nitrito y óxidos de nitrógeno con aminas secundarias y N-alquilamidas, están presentes en ciertas carnes procesadas y se pueden generar de manera endógena tras el consumo de carne roja y procesada (Lijinsky, 1999; Santarelli, Pierre, & Corpet, 2008). Los nitritos y nitratos se usan en la elaboración de ciertos productos cárnicos por diferentes motivos: estabilizan el color, ejercen un efecto antioxidante e inhiben el crecimiento microbiano, especialmente *Clostridium botulinum*. La formación de aminas secundarias en los productos cárnicos se produce a partir de ciertas aminas biógenas

(cadaverina, putrescina, histamina y tiramina) cuando estas se someten a calentamiento. Estas aminas biógenas se forman a partir de microorganismos presentes en la carne y derivados, que mediante enzimas descarboxilasas generan cetoácidos derivados de los aminoácidos libres presentes (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004b). Por lo tanto, al entrar en contacto las aminas secundarias con los nitritos añadidos al producto, la formación de NOCs se ve aumentada. La N-nitrosometildiamina es un NOC presente en diversos embutidos y carnes curadas, su ingesta ha sido asociada con alta incidencia de cánceres gastrointestinales, más específicamente cáncer rectal (Loh *et al.*, 2011). Sin embargo, hay miles de NOCs y no todos son considerados carcinogénicos, por lo que es necesario un mayor estudio al respecto (Williamson *et al.*, 2005). Tanto los nitritos como los nitratos son considerados probables carcinógenos por la WCRF, debido a su capacidad para formar NOCs (WCRF/AICR, 2007). El hierro hemo, presente en la carne, es un componente importante en el desarrollo de los NOCs, ya que actúa como catalizador en su formación a partir de precursores naturales en el intestino (Santarelli *et al.*, 2008).

I.1.3.4. Diabetes tipo 2

Según datos de la WHO en el mundo hay más de 346 millones de personas con diabetes, de las cuales el 90% padecen diabetes tipo 2 (WHO, 2011b). El mismo organismo prevé que las muertes por esta enfermedad se dupliquen entre 2005 y 2030. Los factores de riesgo para la diabetes tipo 2 se reducen fundamentalmente a un exceso de peso corporal y a la inactividad física (WHO, 2011b), aunque antecedentes familiares y la edad jueguen también un papel en su desarrollo. El desarrollo de diabetes tipo 2 ha sido asociado con el consumo de AGS y ácidos grasos *trans*, así como se ha observado una relación inversa frente al consumo de AGP provenientes de vegetales (WHO, 2011b).

La relación del consumo de carne con diabetes tipo 2 ha sido revisada en un meta-análisis en el que se ha asociado un alto consumo de carnes rojas con el riesgo de padecer esta enfermedad; si bien, no se descartan factores de confusión que hayan llevado a esa conclusión (Aune, Ursin, & Veierod, 2009). Análisis más actuales siguen en la misma línea, pero apuntando en mayor medida al consumo de carnes procesadas (Pan *et al.*, 2011). Otros autores asocian la cantidad de sodio de las carnes procesadas con el desarrollo de la enfermedad, recomendando una reducción en su consumo como medida de prevención (Mannisto, Kontto, Kataja-Tuomola,

Albanes, & Virtamo, 2010). Pese a todo ello aún existen inconsistencias que no permiten establecer la cantidad de carne a partir de la cual su consumo pueda aumentar el riesgo de padecer diabetes tipo 2 (Wyness *et al.*, 2011).

I.2. LA CARNE EN EL ÁMBITO DE LOS ALIMENTOS «SALUDABLES»

La industria cárnica, al igual que el resto de la industria alimentaria, ha tenido que adaptarse a los tiempos para poder responder a la creciente demanda de productos que contribuyen a mantener/lograr una salud óptima. Los consumidores han pasado de buscar alimentos que cumplan con los requerimientos nutricionales básicos, a buscar a través de la nutrición óptima una mejora de la calidad de vida y de la salud. En tal sentido en los últimos años está adquiriendo una gran relevancia el desarrollo de productos más saludables que se caracterizan por poseer alguna de las siguientes características: prevenir o limitar la presencia de ciertos compuestos potencialmente perjudiciales (mediante cambios en su composición o procesado) y/o favorecer la presencia de determinadas sustancias (naturalmente presentes o adicionadas) que ejerzan un papel beneficioso en cuanto a salud se refiere (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001).

Dentro de este contexto se encuentran los denominados **alimentos funcionales**. El concepto de alimento funcional comenzó en Japón en la década de los 80, desde donde se extendió a Estados Unidos y Europa. Fue el Primer Ministro de Salud y Bienestar de Japón quien estableció el concepto de *Alimentos de Uso Específico para la Salud* (Foods for Specific Health Use, FOSHU) en el año 1991 (**Tabla 5**). En Europa no fue hasta el año 1998 cuando se llegó a un consenso científico sobre la alimentación funcional. La Unión Europea a través de una Comisión sobre *Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa* (Functional Food Science in Europe, FUFOSSE) y con el apoyo del *Instituto Internacional para las Ciencias de la Vida* en Europa (International Life Science Institute, ILSI) elaboró un documento consenso donde establecieron las bases y conceptos necesarios para el desarrollo de este tipo de productos (Diplock *et al.*, 1999). Diversas organizaciones internacionales también han propuesto definiciones de alimentos funcionales (Tabla 5).

A raíz de estas definiciones cabe resaltar que dentro de este grupo de alimentos no solo hay que considerar aquellos que han sufrido una transformación en su composición (ya sea por métodos tecnológicos o biotecnológicos), sino que también se encuentran aquellos alimentos que de forma natural contengan compuestos bioactivos que provoquen efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor. El

mercado de los alimentos funcionales está en continua expansión, a finales de los años 90 en Europa, el mercado de los alimentos funcionales suponía algo menos del 1% del mercado de la alimentación, valoraciones más recientes estiman que el volumen de este mercado es de más de 10000 millones de euros (superando el 1%), esperándose un incremento anual del 16% (Kotilainen, Rajalahti, Ragasa, & Pehu, 2006). La importancia que este tipo de alimentos tiene en la sociedad actual es patente y la industria cárnica también está haciendo su esfuerzo para poder competir en este mercado. Apoyándose en la investigación científica se han acometido diferentes estrategias para el desarrollo de productos cárnicos más saludables que se recogen a continuación.

Tabla 5. Definiciones de Alimento Funcional

Ministro Japonés de Salud y Bienestar: Los FOSHU son alimentos de los que, basados en el conocimiento sobre la relación entre alimentos o componentes de los mismos y la salud, se espera que generen beneficios sobre la salud y puedan ser autorizados para llevar en su etiquetado una alegación que exponga que una persona que los use pueda esperar un beneficio sobre la salud a través del consumo de estos alimentos (Arihara, 2004).

FUFOSE: Se considera alimento funcional aquel que pueda demostrar de manera satisfactoria que afecta beneficiosamente a una o más funciones selectivas del organismo, además de aportar sus efectos nutritivos intrínsecos, de tal modo que resulta relevante para mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducir el riesgo de enfermedad. Un alimento funcional debe seguir siendo un alimento y debe demostrar sus efectos en las cantidades normales en las que habitualmente se consume en la dieta: no es un comprimido ni una pastilla, sino parte de un patrón normal de alimentación (Diplock *et al.* 1999)

Asociación Dietética Americana: Los alimentos funcionales son alimentos que aportan beneficios a la salud además de los nutrientes que contienen.

FAO: Los alimentos funcionales deben ser alimentos con apariencia similar a los alimentos convencionales (bebidas, alimentos sólidos), deben consumirse como parte de la dieta habitual y contener componentes biológicamente activos con demostrados efectos fisiológicos además de poder reducir el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas y aportar sus nutrientes básicos.

FESNAD/SENC/CECU¹: Se consideran alimentos funcionales aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades. Además deben consumirse dentro de una dieta sana y equilibrada y en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen el resto de los alimentos. (Instituto Omega 3, 2003)

¹Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética/Sociedad Española de Nutrición Comunitaria/Confederación de Consumidores y Usuarios

I.2.1. Estrategias para la producción de carne y derivados más saludables

Existen, fundamentalmente, dos tipos de estrategias que se utilizan para el desarrollo de carne y productos cárnicos más saludables, éstas son:

1. Genéticas o nutricionales. Nivel de producción animal
2. Reformulación de productos cárnicos

En los siguientes puntos se van a tratar cada una de estas estrategias haciendo especial hincapié en la reformulación de los productos cárnicos, ya que es la que se ha utilizado en este estudio.

I.2.1.1. Modificación de la composición de la carne

La composición de la carne varía según la especie, pero también lo hace frente a otros factores entre los que se incluyen la edad, alimentación, sexo y dieta. Es por esto por lo que parece plausible pensar que durante la etapa de producción animal esta composición puede alterarse, para así producir una carne con propiedades más saludables.

Existen diversas estrategias encaminadas a inducir cambios en componentes de la carne tales como proteínas, lípidos, ácidos grasos, vitaminas, etc. La selección de razas y líneas genéticas ha permitido alterar, significativamente, la composición de la carne, reduciendo su nivel de grasa y aumentando su grado de insaturación (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001). La alimentación y el sistema de cría pueden modificar la calidad de la carne de cerdo transformando los niveles de grasa y composición muscular (afectando a la grasa intramuscular), pero estos efectos se ven limitados cuando son estudiados sobre cerdos con genotipos convencionales (Lebret, 2008). Sin embargo, las interacciones positivas entre genotipo y ambiente quedan demostradas al obtenerse carne de cerdo de alta calidad en los criaderos extensivos locales (Lebret, 2008). Los niveles de proteína y energía de la dieta afectan a la proporción de grasa intramuscular, produciendo carnes más magras cuando se aplican estrategias de restricción calórica y dietas con exceso de proteínas (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001). A la hora del desarrollo de carne más saludable, cobra importancia la composición de ácidos grasos de la misma. En los animales monogástricos, esta composición de ácidos grasos puede verse fácilmente manipulada a través del régimen alimenticio, como consecuencia de la conocida influencia de los ácidos grasos dietéticos en la deposición de los mismos en la grasa, tanto subcutánea como intramuscular (Lebret, 2008). En los últimos años ha crecido el

interés para producir carnes con un nivel aumentado de AGP n-3 o n-6, utilizándose para ello dietas ricas en granos y aceites vegetales obteniéndose resultados significativos (Wood *et al.*, 2008). Este tipo de carne también se ha ensayado como ingrediente en la fabricación de diversos productos cárnicos, entre ellos salchichas y patés (D'Arrigo *et al.*, 2004; Estévez, Morcuende, & Cava, 2006; Estévez, Morcuende, Ramírez, Ventanas, & Cava, 2004; Lin, Lin, & Kuo, 2002; Martín, Antequera, Muriel, Pérez-Palacios, & Ruiz, 2009). El incremento de ácidos grasos insaturados en la carne debe unirse a un incremento de la capacidad antioxidante para evitar trastornos oxidativos, y con ello un deterioro del sabor y olor de la carne. Al respecto, se ha demostrado que una suplementación con altos niveles de vitamina E puede prevenir la oxidación de AGP, e incluso mejorar la estabilidad del color y aumentar su capacidad de retención de agua (Lebret, 2008). Se ha ensayado el aumento de los niveles de selenio en carne utilizando suplementos de selenio orgánico en la alimentación de animales como pollo, cerdo y ternera (Fisinin, Papazyan, & Surai, 2009).

1.2.1.2. Reformulación de derivados cárnicos

Es la estrategia más utilizada a la hora de diseñar nuevos productos cárnicos saludables, ya que es más rápida que las técnicas aplicadas en la producción animal al incidir directamente en el desarrollo del producto final. Dependiendo del tipo de derivado cárnico, durante la preparación del mismo, su composición puede ser fácilmente alterada optimizando la cantidad de componentes que juegan un papel en la salud del consumidor. Así, existen dos tipos de estrategias desarrolladas: por un lado la reducción de componentes, que consumidos en altas cantidades, puedan resultar perjudiciales (grasa, AGS, sal, nitritos, etc.) y por otro la incorporación de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud (proteínas vegetales, antioxidantes, AGM, AGP, etc). Más adelante se analizarán en profundidad estas estrategias (1.2.3. y 1.2.4.)

La importancia de los transformados cárnicos en la dieta ya ha sido discutida con anterioridad (1.1.2. y Figura 2). Dentro ellos cabría destacar a los productos cárnicos tipo gel/emulsión como salchichas tipo frankfurt y patés; alimentos ampliamente consumidos pero con ciertas limitaciones debido a su posible relación con el desarrollo de enfermedades, fundamentalmente asociadas a su composición lipídica (Tablas 3 y 4). Este aspecto, unido a las características texturales y sensoriales, hace que la aplicación de una estrategia de reformulación en este tipo de productos podría mejorar sustancialmente sus propiedades nutricionales.

En el siguiente punto se detallan algunas de las características de este tipo de productos para poder entender mejor la aplicación de posibles estrategias de reformulación.

I.2.2. Productos cárnicos tratados por el calor. Sistemas gel/emulsión: salchichas tipo frankfurt y patés.

La mayoría de este tipo de productos se basan en la formación de las denominadas pastas finas, que no son sino emulsiones cárnicas donde el picado de la carne ha sido muy intenso. Es importante explicar el concepto de emulsión cárnica, ya que es la base para entender el posterior proceso de fabricación. Se denomina emulsión cárnica a una mezcla análoga a la de una emulsión de grasa en agua, donde los constituyentes de la carne se encuentran dispersos formando una fase continua y una discontinua. Los glóbulos de grasa constituyen la fase discontinua, mientras que la fase continua está formada por una disolución acuosa de sales y proteínas solubles e insolubles en suspensión, así como porciones de fibra muscular y restos de tejido conectivo (**Figura 5**).

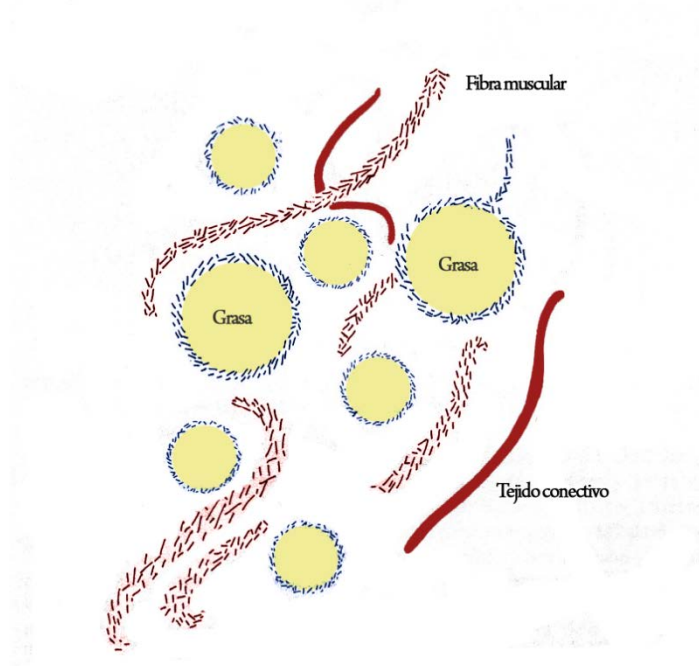


Figura 5. Esquema de una emulsión cárnica (Kramlich, Pearson, & Tauber, 1973)

Las proteínas miofibrilares de la carne (fundamentalmente la miosina) son los principales agentes capaces de emulsificar la grasa. Esto se debe a su carácter polar

que permite establecer uniones hidrófilas con la matriz acuosa e hidrófobas con las grasas, formando una matriz proteica o película alrededor del glóbulo de grasa. Este tipo de proteínas son insolubles en agua y soluciones salinas diluidas, pero son solubles en soluciones salinas de mayor concentración. Por lo tanto, la cantidad de sal presente a la hora de formarse la emulsión, es un factor muy a tener en cuenta a la hora de determinar la eficacia emulsionante de las proteínas y por ende, la estabilidad de la emulsión. Se puede decir entonces, que el papel fundamental de la sal a la hora de formar emulsiones cárnicas es la solubilización de las proteínas miofibrilares, permitiendo que éstas recubran las partículas de grasa. Pero la concentración de sal no es el único factor a tener en cuenta en la estabilidad de una emulsión cárnica, otros factores como el pH de la carne, la temperatura, el grado de picado (tamaño de las gotas de grasa) y la viscosidad de la emulsión, también afectan a su estabilidad.

La emulsión cárnica formada experimenta un proceso de gelificación, debido al tratamiento térmico. Cuando la emulsión cárnica alcanza unos 45°C, las proteínas miofibrilares inician el proceso de desnaturalización, produciéndose un despliegue de las cadenas polipeptídicas que posteriormente se asocian (mediante distintos tipos de enlace) formando redes tridimensionales. En el interior de estas redes se encuentran inmovilizadas agua y partículas de grasa, además de otros componentes del sistema. La estabilidad del gel formado dependerá fundamentalmente de la temperatura, el pH y las concentraciones de sal y proteína. El tratamiento térmico termina, en la mayoría de los casos, al alcanzar los 70 °C en el centro térmico, para asegurar el haber destruido la carga microbiana patógena.

Tanto las salchichas tipo frankfurt como los patés, son dos ejemplos de productos cárnicos tipo gel/emulsión. En el caso de las salchichas tras la realización de la emulsión cárnica tiene lugar un embutido en tripas de pequeño diámetro, que se llevan a tratamiento térmico. Garantizando así la pasteurización y las cualidades fisicoquímicas adecuadas, generalmente se comercializan bajo refrigeración. Los patés pueden fabricarse de diferentes maneras, pero la mayoría tienen su base en la emulsión cárnica, a la que se incorporan despojos (fundamentalmente hígado) y diversos agentes emulsionantes. Después se rellenan los recipientes adecuados y se aplicará el tratamiento térmico sobre los mismos. En general, la temperatura utilizada es superior a la empleada en el procesado de las salchichas tipo frankfurt. La mayoría de los patés se comercializan sin necesidad de frío.

I.2.3. Reducción/eliminación de componentes con implicaciones negativas para la salud en la reformulación de productos cárnicos

El desarrollo de productos cárnicos más saludables se fundamenta en la reducción de ciertos componentes, que consumidos en altas cantidades pueden provocar un efecto «nocivo» sobre el consumidor (I.1.3.). Así pues, este tipo de estrategia se ha centrado en la reducción energía, grasa, colesterol, sodio y nitritos

I.2.3.1. Grasa y energía

El desarrollo de productos bajos en calorías está basado, fundamentalmente, en la disminución del contenido graso. Esto es debido a que la grasa posee un poder energético más elevado que el resto de macronutrientes (9 kcal/g frente a 4 kcal/g de carbohidratos y proteínas). También hay que reseñar que la cantidad de grasa de la carne influye en la proporción de ácidos grasos, así, el contenido de AGS y AGM aumenta en mayor cantidad que el de AGP al aumentar el contenido graso de la carne (Raes, De Smet, & Demeyer, 2004), siendo los AGS los asociados con potenciales efectos negativos sobre la salud (I.1.3.). La elevada cantidad de lípidos presentes en los productos cárnicos (entre el 20 y 40%), ha llevado al desarrollo de salchichas y patés con contenidos grasos más bajos. Para ello se lleva a cabo un proceso de reformulación empleando materias primas magras y cantidades adecuadas de agua, grasa (animal o vegetal dependiendo de la nueva composición), saborizantes y otros ingredientes (sustitutos de grasa), que unidos a un procesado tecnológico conveniente, dotan al producto de la mejora nutricional perseguida sin comprometer sus propiedades sensoriales y tecnológicas (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001)

Es común la reformulación de salchichas tipo frankfurt mediante el aumento de la cantidad de **agua** en detrimento de la cantidad de grasa (Park, Rhee, & Ziprin, 1990; Sylvia, Claus, Marriott, & Eigel, 1994); esta estrategia de reformulación puede llegar a presentar ciertos problemas tecnológicos. Esto es debido a la disminución de la fuerza iónica que se produce al diluir la presencia de proteínas y grasa en la emulsión cárnica, produciendo una alteración de las propiedades tecnológicas de la misma. Los productos así originados serán más blandos, secos y con peor palatabilidad, ya que su retención de agua se ve disminuida (Jiménez-Colmenero, 2000).

Una alternativa podría ser la reducción del contenido en grasa aumentando el contenido en **proteína cárnica**, pero tanto en patés como en otros productos gel/emulsión la dureza se ve aumentada (Carballo, Fernández, Barreto, Solas, & Jiménez-Colmenero, 1996b; Estévez, Ventanas, & Cava, 2005).

Otra posibilidad es la utilización de **sustitutos no cárnicos**, generalmente proteínas o carbohidratos, que mejoran las propiedades tecnológicas y sensoriales de los nuevos productos bajos en grasa además de disminuir su contenido energético. Proteínas vegetales, procedentes del huevo y la leche, son las más utilizadas como sustitutos de la grasa (Fernández-Martín *et al.*, 2000; Hong Chul & Koo Bok, 2009; Hughes, Mullen, & Troy, 1998; Pietrasik, Jarmoluk, & Shand, 2007; Viana, Silva, Delvivo, Bizzotto, & Silvestre, 2005; Yoo, Kook, Park, Shim, & Chin, 2007). Los hidratos de carbono utilizados como sustitutos de grasa en productos tipo gel emulsión son muy variados, destacando almidones, carragenatos, maltodextrinas y fibras dietéticas de distintos tipos (cereales, frutas y diferentes vegetales) (Cofrades, Hughes, & Troy, 2000; Crehan, Hughes, Troy, & Buckley, 2000; Grigelmo-Miguel, Abadías-Seros, & Martín-Belloso, 1999; Hughes *et al.*, 1998; Kaack & Pedersen, 2005; Lurueña-Martínez, Vivar-Quintana, & Revilla, 2004; Steenblock, Sebranek, Olson, & Love, 2001). Otro ingrediente que se está utilizando como sustituto de la grasa es la harina de konjac. Este polisacárido procede del tubérculo *Ammorphophallus konjac*, es muy utilizado en Asia y posee propiedades tecnológicas interesantes como el aumento de la capacidad de retención de agua y capacidad gelificante y espesante. Se ha estudiado su utilización en diferentes productos cárnicos, entre ellos salchichas tipo frankfurt (Chin, Keeton, Miller, Longnecker, & Lamkey, 2000; Kao & Lin, 2006; Lin & Huang, 2003).

I.2.3.2. Colesterol

Pese a que no está muy clara la implicación directa del colesterol dietético en el desarrollo de ECV (I.1.3.3.), la WHO recomienda una ingesta máxima de 300 mg/día (WHO, 2003). Es por ello por lo que en los productos cárnicos también se ha buscado disminuir la cantidad de este compuesto, presente en los mismos en ciertas cantidades (Tabla 4). Una disminución de la grasa intra e intermuscular de la carne podría parecer la estrategia a seguir, pero no existe relación directa entre el colesterol y la cantidad de grasa de la pieza de carne, por lo que reducir grasa no resulta un método viable para reducir los niveles de colesterol en productos cárnicos (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001). Para poder limitar la cantidad de colesterol de los productos cárnicos se han llevado a cabo estrategias de sustitución, reemplazando cantidades de carne y grasa animal (ya que las células animales son las que contienen colesterol) por productos vegetales, que no contienen este componente. Numerosos estudios sobre productos cárnicos han sido reformulados para producir un descenso en su nivel

de colesterol, utilizando para ello diferentes aceites vegetales (nuez, oliva, canola, soja, semilla de algodón, cacahuete, etc.) y sustitutos no cárnicos (soja, carragenatos, pectinas, fibras, etc.). Con tales procedimientos se han obteniendo reducciones significativas de los niveles de colesterol (Candogan & Kolsarici, 2003; Choi *et al.*, 2009; López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jiménez-Colmenero, 2009; Márquez, Ahmed, West, & Johnson, 1989; Paneras, Bloukas, & Filis, 1998; Yildiz-Turp & Serdaroglu, 2008)

I.2.3.3. Sodio

La reducción de sodio en los productos cárnicos requiere la sustitución parcial del cloruro sódico añadido en la formulación por otros componentes que tengan efectos similares en las propiedades tecnológicas, sensoriales y microbiológicas (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001). El cloruro sódico se añade a los productos cárnicos principalmente por tres motivos: aumenta la vida útil de los productos, es un componente crítico en el desarrollo del sabor y olor característico de los productos y juega un papel fundamental en la textura final de los mismos (Weiss, Gibis, Schuh, & Salminen, 2010). Existen tres estrategias fundamentales a la hora de disminuir el contenido en sal de los derivados cárnicos (Weiss *et al.*, 2010). La primera de ellas, y más utilizada, consiste en la sustitución del cloruro sódico por cloruro potásico, la problemática surge con la aparición de sabores metálicos y amargos en altas dosis, por lo que se están utilizando mezclas complejas de diferentes sales alternativas para evitar los efectos no deseados (Desmond, 2006). La segunda estrategia consiste en la adición de agentes enmascarantes y potenciadores del sabor, que si bien no producen un sabor salado, sí potencian este sabor al combinarse con la sal. Por último, han surgido nuevas tecnologías basadas en la alteración de la estructura del cloruro sódico, generándose partículas más finas que se disuelven con más rapidez en la boca produciendo un efecto más prolongado de la sensación salada.

En el desarrollo de productos cárnicos con bajo nivel de sal, se han utilizado diferentes compuestos que no solo ayudan a mantener el sabor salado sino que también mejoran las propiedades tecnológicas. Así, en combinación con las sales se han utilizado fosfatos, sales de ácidos orgánicos y carbohidratos (sacarosa, trehalosa, carragenatos, fibras dietéticas, etc.) para producir salchichas tipo frankfurt y diversos embutidos con reducciones de sal de hasta el 90% (Jimenez-Colmenero, Ayo, & Carballo, 2005; López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas *et al.*, 2009; Ruusunen *et al.*, 2003, 2003; Verma, Sharma, & Banerjee, 2010).

I.2.3.4. Nitratos y nitritos

La contribución de los nitratos y nitritos adicionados en los productos cárnicos a la formación de nitrosaminas (I.1.3.3.) es la razón fundamental por la que se ha señalado la necesidad de una reducción de los mismos. Para contribuir a evitar la formación de estos compuestos carcinogénicos se llevan a cabo dos estrategias: reducir o eliminar la cantidad de nitratos y nitritos o adicionar inhibidores de la formación de nitrosaminas.

Reduciendo el nivel de estos compuestos se puede disminuir la cantidad de nitrito residual presente en el producto final hasta un 80%, pero los efectos antimicrobianos, antioxidantes y organolépticos que el nitrito produce, hace imposible que se pueda evitar su utilización si no es adicionando diferentes compuestos, que juntos, puedan llegar a reemplazar sus efectos (Jiménez Colmenero *et al.*, 2001). Diversos colorantes se utilizan para asemejar el efecto que producen los nitritos sobre el color de los productos cárnicos, técnicas de reducción de la actividad de agua y adición de zumos de frutas se han utilizado para imitar su efecto antimicrobiano; sin embargo, se necesita más investigación al respecto (Demeyer, Honikel, & De Smet, 2008).

Un alternativa es buscar la inhibición de la formación de las nitrosaminas, para ello se han utilizado diferentes ingredientes con capacidad antioxidante, como por ejemplo tocoferol y algunos extractos vegetales (romero, catequinas, subproductos derivados del limón, etc.) (Demeyer *et al.*, 2008). También se ha ensayado la adición de ácido ascórbico, ya que este compuesto asegura la conversión de nitrito a óxido nítrico reduciendo así las probabilidades de formación de nitrosaminas (Toldrá & Reig, 2011).

I.2.3.5. Alérgenos

En la producción de diversos productos cárnicos se utilizan algunos ingredientes que pueden causar alergias en el consumidor. Mediante el Real Decreto 1245/2008 se determinan aquellos ingredientes que deben indicarse en el etiquetado por ser posibles alérgenos, entre los que se incluyen proteínas vegetales y derivados del huevo o de la leche, todos ellos utilizados en la elaboración de productos cárnicos. Algunos derivados cárnicos que no contienen estos ingredientes son considerados libres de alérgenos y algunos han sido aprobados como FOSHU en Japón (Arihara, 2004).

I.2.4. Incorporación de ingredientes funcionales en la reformulación de productos cárnicos

En la última década se ha llevado a cabo un extenso estudio sobre la incorporación de ingredientes funcionales en los productos cárnicos. La cantidad y variedad de estos es extensa y el uso de unos u otros depende del efecto buscado y del producto a desarrollar. La incorporación de compuestos bioactivos en los productos cárnicos es un método que permite, por un lado, llegar a un amplio número de consumidores, y por otro, mejorar las implicaciones nutricionales relacionadas con la salud de los derivados cárnicos tradicionales. Es por ello por lo que existen diversos estudios de incorporación de ingredientes bioactivos, fundamentalmente de origen vegetal, que dotan a los productos de ese carácter funcional.

I.2.4.1. Ácidos grasos insaturados

Debido a su notable importancia, los lípidos han sido los componentes bioactivos (ingredientes funcionales) que más atención han recibido, particularmente con respecto al desarrollo de productos cárnicos saludables (Anandh, Lakshmanan, & Anjaneyulu, 2003; Arihara, 2006; Fernández-Ginés, Fernández-López, Sayas-Barberá, & Pérez-Álvarez, 2005; Jiménez-Colmenero, Reig, & Toldrá, 2006; Jiménez Colmenero *et al.*, 2001; Muguerza, Gimeno, Ansorena, & Astiasarán, 2004b). La estrategia que generalmente se lleva a cabo es la sustitución de la grasa animal, que normalmente presentan este tipo de productos, por otras grasas cuyas características se acerquen más a las recomendaciones nutricionales. Es decir, se busca disminuir la presencia de AGS aumentando la cantidad de ácidos grasos insaturados (AGM y/o AGP), CLA y a ser posible sin colesterol (Jiménez-Colmenero, 2007). Aunque mediante esta estrategia no se reduce el contenido energético del producto, la mejora del perfil de ácidos grasos es evidente. Así pues, se han llevado a cabo sustituciones de la grasa animal por grasas de origen vegetal y marino en diversidad de productos cárnicos, entre los que se encuentran salchichas tipo frankfurt y patés. Para contribuir a un aumento de la cantidad de AGM en el producto final, el aceite de oliva ha sido el aceite más empleado. Esto se debe a que es uno de los aceites vegetales más monoinsaturados y que además contiene gran cantidad de antioxidantes naturales (vitamina E, carotenoides y diversos polifenoles: como hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína) (Jiménez Colmenero, Herrero, Cofrades, & Ruiz-Capillas, 2011). La sustitución, parcial o total, de tocino de cerdo por aceite de oliva ha sido estudiada ampliamente en salchichas tipo frankfurt y algo menos en patés (Bloukas & Paneras,

1993; Bloukas, Paneras, & Fournitzis, 1997; López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009; Lurueña-Martínez *et al.*, 2004; Martín, Ruiz, Kivikari, & Puolanne, 2008; Paneras & Bloukas, 1994; Pappa, Bloukas, & Arvanitoyannis, 2000; Vural, Javidipour, & Ozbas, 2004). Mediante la incorporación de aceite de girasol alto-oleico también se ha conseguido producir salchichas tipo frankfurt con alta cantidad de AGM (Park *et al.*, 1990; Park, Rhee, Keeton, & Rhee, 1989). Otros aceites vegetales se han utilizado como sustitutos de la grasa animal por su alto contenido en AGP. Así, se encuentran salchichas y patés con alto contenido en AGP fabricadas con la incorporación de diversos aceites como cacahuete, maíz, soja y semilla de algodón (Hong, Lee, & Min, 2004a; Márquez *et al.*, 1989; Paneras & Bloukas, 1994; Paneras *et al.*, 1998; Vural *et al.*, 2004). Mediante el uso de estos aceites se consigue una mejora del ratio AGP/AGS, pero se desatiende más la cantidad de AGP n-3 y n-6 que los mismos aportan, así como el ratio n-6/n-3. Por ello, y por los beneficios asociados al consumo de AGP n-3, se ha estudiado el enriquecimiento de productos cárnicos con grasas ricas en estos compuestos. El aceite de linaza ha sido utilizado en la elaboración de diversos embutidos (Ansorena & Astiasaran, 2004; Pelser, Linssen, Legger, & Houben, 2007; Valencia, Ansorena, & Astiasaran, 2007; Valencia, O'Grady, Ansorena, Astiasaran, & Kerry, 2008) para aumentar la cantidad de AGP n-3 del producto. La nuez, como fuente de este tipo de ácidos grasos, también ha sido ensayada en salchichas tipo frankfurt (Jiménez-Colmenero, Cofrades *et al.*, 2010). Pero son los aceites de pescado o de algas, los que más se han utilizado como fuente de AGP n-3 de cadena larga (EPA y DHA) en la producción de derivados cárnicos tales como salchichas, mortadelas, hamburguesas y productos fermentados (Cáceres, García, & Selgas, 2008; Lee *et al.*, 2006; López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009; Muguerza, Ansorena, & Astiasarán, 2004a; Park *et al.*, 1989; Valencia *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2008). El problema asociado al uso de este tipo de aceites es, por un lado, la mayor susceptibilidad a la oxidación lipídica, y por otro, aromas y sabores a pescado residuales (Jiménez-Colmenero, 2007).

1.2.4.2. Proteínas, péptidos y aminoácidos.

Como ya se ha comentado en un punto anterior (1.2.3.1), se han utilizado proteínas no cárnicas como sustitutas de la grasa animal. Pero más allá de la reducción del contenido energético y de colesterol que esto produce, hay proteínas vegetales que además poseen efectos potencialmente funcionales. Un ejemplo de esto puede ser el uso de proteínas del lactosuero, en las cuales se ha estudiado una

probable actividad anticancerígena en animales (McIntosh *et al.*, 1998). También se han usado este tipo de proteínas como recubrimiento en embutidos bajos en grasa, disminuyendo la oxidación del producto (Shon & Chin, 2008). Otras proteínas de origen vegetal, como girasol y nuez, contienen altas proporciones de arginina y una relación lisina/arginina bastante baja, produciendo un efecto beneficioso sobre el colesterol, la presión arterial y ataques al corazón (Jiménez Colmenero *et al.*, 2011). En productos cárnicos se ha incorporado nuez con este objetivo (Jiménez-Colmenero, Sánchez-Muniz, Olmedilla-Alonso, & Collaborators, 2010). La proteína de soja es ampliamente utilizada en los productos cárnicos en la forma de harina, concentrado y aislado, mejorando las características tecnológicas y nutricionales del producto (Zhang, Xiao, Samaraweera, Lee, & Ahn, 2010). Además de eso, está implicada en la reducción de riesgo de ECV, prevención del cáncer y osteoporosis, así como en la reducción de los síntomas de la menopausia debido a ciertos componentes como la isoflavona (Jiménez Colmenero *et al.*, 2011). Diversos productos FOSHU han utilizado proteína de soja como ingrediente funcional, entre ellos embutidos bajos en grasa, alegando que puede mantenerse un nivel de colesterol aceptable con su consumo (Arihara, 2004).

Los **péptidos bioactivos** son secuencias inactivas de aminoácidos cuando forman parte de las proteínas nativas, pero que se activan una vez son liberadas mediante distintos tipos de procesos proteolíticos. Al ser liberados, los péptidos bioactivos pueden actuar como componentes reguladores de diferentes funciones fisiológicas. En la carne y productos derivados, se han encontrado diversos péptidos bioactivos con actividades antihipertensivas, antioxidantes o prebióticas (Arihara, 2006). Aunque todavía no existe mucha información sobre este tipo de compuestos, cada vez surgen más evidencias científicas. Los péptidos bioactivos procedente de proteínas alimentarias más estudiados han sido los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I (*Angiotensin I Converting Enzyme, ACE*). Este tipo de péptidos tienen la habilidad de prevenir la hipertensión llegando a ser utilizados como ingredientes funcionales, constituyendo una alternativa natural y saludable frente a las ACE-inhibidoras (Arihara, 2006). La principal fuente de este tipo de péptidos es el músculo de cerdo, aunque cada vez se han extraído más péptidos bioactivos en diferentes materias cárnicas (Ryan, Ross, Bolton, Fitzgerald, & Stanton, 2011).

1.2.4.3. Probióticos

Se denomina probiótico a todo aquel microorganismo vivo que administrado en la cantidad adecuada proporciona beneficios saludables al hospedador (FAO/WHO,

2002). Diversos estudios han descrito los beneficios que genera el consumo de alimentos con estos microorganismos, entre ellos cabe destacar: actividad antimicrobiana, mejora en las infecciones gastrointestinales, estimulación del sistema inmune, actividad anti-cancerígena y antidiarreica, etc. (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

La mayoría de los alimentos utilizados como vehículo de probióticos son derivados de la industria láctea, pero cada vez más se está extendiendo el campo hacia otro tipo de productos alimentarios. Así pues, los productos cárnicos pueden usarse para generar alimentos probióticos. La carne ha demostrado ser un excelente vehículo para los probióticos, fundamentalmente se han estudiado los productos cárnicos crudos fermentados en los que no se aplica calor en su procesado (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010). Este tipo de productos puede suponer un mercado prometedor para la industria cárnica, ya que se abriría un nuevo abanico de productos para el consumidor. El problema que reside en la inclusión de probióticos en los productos cárnicos fermentados es que la supervivencia de los mismos es bastante baja, por lo que se están estudiando diferentes técnicas de encapsulamiento y de mejora de la supervivencia. Existen productos cárnicos probióticos comercializados, en Japón y en Alemania (Arihara, 2006).

I.2.4.4. Prebióticos y fibra dietética

Se denominan prebióticos a los ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped, estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un limitado número de bacterias del colon, mejorando así la salud del huésped (Gibson & Roberfroid, 1995). Recientemente, sin embargo, se ha propuesto aumentar la definición incluyendo toda la microflora gastrointestinal y no solo al ecosistema del colon (Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004).

En el procesado de alimentos el ingrediente prebiótico más utilizado ha sido la fibra dietética (carbohidratos complejos de origen vegetal que no son digeridos por el organismo humano). Se ha estudiado la incorporación de fibra dietética (de cereales y frutas principalmente) como ingrediente funcional en diversos productos cárnicos, entre ellos cocidos como salchichas tipo frankfurt (Bastida *et al.*, 2009; Cáceres, García, Toro, & Selgas, 2004; Fernández-Ginés, Fernández-López, Sayas-Barbera, Sendra, & Pérez-Álvarez, 2004; García, Cáceres, & Selgas, 2006, 2007; Jiménez-Colmenero, Sánchez-Muniz *et al.*, 2010; López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas *et al.*,

2009; Pietrasik & Janz, 2010; Steenblock *et al.*, 2001; Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010; Vural *et al.*, 2004).

I.2.4.5. Vitaminas y antioxidantes

Se ha sugerido que el consumo de antioxidantes mediante la dieta puede ser beneficioso para la salud en aspectos como la función inmune, enfermedades del corazón y cáncer (Decker & Park, 2010). Las vitaminas A, C y E poseen un potencial antioxidante considerable, pero no se encuentran en cantidades considerables en la carne (Tabla 3). Por ello y por el problema que supone la oxidación de lípidos en el deterioro de los productos cárnicos, se ha estudiado la utilización de estas vitaminas como ingredientes antioxidantes en tales alimentos. La adición de **vitamina C** a productos cárnicos presenta alguna limitación, ya que no es muy estable al pH de la carne y podría promover la oxidación lipídica (Haak, Raes, & De Smet, 2009; Sánchez-Escalante, Djenane, Torrescano, Beltrán, & Roncales, 2003). Además, en algunos casos, la adición de vitamina C está prohibida, porque produce cambios en el color del producto final, considerándose adulteración (Decker & Park, 2010). Una alternativa para el uso de esta vitamina es el incorporarla a través de alimentos ricos en la misma como son los cítricos (Fernández-López *et al.*, 2004). Algunos carotenoides son fuentes de **vitamina A** y aunque la carne no posee gran cantidad de la misma, sí se han añadido como ingredientes funcionales en productos cárnicos ya sea mediante alimentos ricos en los mismos (como zanahoria o batata) o mediante adición directa (García, Calvo, & Selgas, 2009; Granado-Lorencio *et al.*, 2010; Hayes, Stepanyan, Allen, O'Grady, & Kerry, 2010; Kim, Jin, Mandal, & Kang, 2011). El contenido de la carne en **vitamina E** generalmente es reducido, concentrado principalmente en los tejidos adiposos, pero los cambios en la alimentación animal han supuesto un incremento de esta vitamina en la carne, hasta tal punto que la carne ha pasado a ser una fuente moderada de vitamina E (Jiménez Colmenero *et al.*, 2011). La vitamina E, se ha incorporado a diversos productos cárnicos en forma de tocoferol (Aksu, 2007; Fang, Ruitong, Jinyuan, & Xingmin, 2010; Haak *et al.*, 2009; Magrinya *et al.*, 2009; Santos, Ordoñez, Cambero, D'Arrigo, & Hoz, 2004).

La ingesta de vitamina B₉ (o **ácido fólico**) se encuentra por debajo de los niveles recomendados en más del 90% de las mujeres europeas fértiles (Biesalski, 2005) y no alcanza el 80% de las IR en España (MSSI/AESAN, 2012b). Debido a que la carne no posee gran cantidad de esta vitamina (aunque sí el hígado y los patés), se ha estudiado el enriquecimiento con ácido fólico de embutidos tratados por el calor,

crudos curados y hamburguesas (Galan, Garcia, & Selgas, 2010; Galan, Garcia, & Selgas, 2011; Galan, Garcia, & Selgas, 2011).

Un gran grupo de antioxidantes están presentes en especias y frutas, generalmente pertenecientes al grupo de los polifenoles o los flavonoides. Extractos de frutas de uva, madroño, espino, agavanzo, mora y algarrobo, se han añadido como antioxidantes en diferentes productos cárnicos (Bastida *et al.*, 2009; Ganhao, Morcuende, & Estevez, 2010; Sayago-Ayerdi, Brenes, & Goni, 2009). Diversas plantas y especias (romero, té, orégano, borraja, regaliz, clavo, cardamomo, etc.) han servido como fuente de antioxidantes en el desarrollo de derivados cárnicos (Haak *et al.*, 2009; Kong, Zhang, & Xiong, 2010; Sánchez-Escalante *et al.*, 2003; Valencia *et al.*, 2008, entre otros).

I.2.4.6. Minerales

Los minerales son nutrientes esenciales que juegan un papel fundamental en la salud ósea, tensión arterial, función muscular y nerviosa y regulación de los niveles de glucosa en sangre, por lo tanto son importantes en el desarrollo de enfermedades como ECV, osteoporosis y diabetes (Decker & Park, 2010). Como ya se ha recogido en un epígrafe anterior (I.1.2.), la carne es rica en algunos de estos minerales, habiendo desarrollado estrategias para aumentar la cantidad de aquellos que están en concentraciones más bajas.

Debido a las grandes implicaciones que el **calcio** tiene en el organismo, desde la contribución a la salud ósea, hasta un probable efecto protector frente al cáncer de colon y recto, la industria alimentaria ha desarrollado diversos alimentos enriquecidos con este mineral. Como la carne es una fuente pobre de calcio (alrededor de 10 mg/100 g), se han desarrollado diversas estrategias tecnológicas para conseguir productos cárnicos enriquecidos en calcio (Arihara, 2004; Caceres, Garcia, & Selgas, 2006; Selgas, Salazar, & Garcia, 2009; Tapola, Lyyra, Karvonen, Uusitupa, & Sarkkinen, 2004). Una fortificación de los productos cárnicos con la adición de calcio, **magnesio** o **potasio** puede ser utilizada como estrategia para reducir la cantidad de sodio del producto (Moon, Kim, Jin, & Kim, 2008). Por otro lado, el nivel de ciertos minerales (Cu, Mg, Mn, K, etc.) puede verse incrementado en el producto final mediante la adición de ingredientes no cárnicos (nueces, algas, etc.) (Jiménez-Colmenero, Sánchez-Muniz *et al.*, 2010; López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas *et al.*, 2009).

I.2.5. Mejora del perfil lipídico en productos cárnicos. Grasas de origen vegetal y marino

Como ya se ha explicado con anterioridad, para la obtención de productos cárnicos más saludables una de las principales estrategias a seguir es la aplicación de procesos de reformulación. En el caso de la mejora en el perfil lipídico, estos procesos se basan, generalmente, en la sustitución en mayor o menor medida de la grasa animal normalmente presente en el producto, por otra cuyas características estén más en consonancia con las recomendaciones nutricionales, es decir, con menor proporción de AGS y mayor de AGM y AGP (especialmente AGP n-3 de cadena muy larga), mejores relaciones n-6/n-3 y si es posible libres de colesterol. Una extensa variedad de grasas de origen vegetal (oliva, canola, girasol, etc.) y marino (algas y pescado) han sido utilizadas (I.2.4.1) como sustitutos parciales de la grasa animal (principalmente cerdo y vacuno) en diversos productos cárnicos (Jiménez-Colmenero, 2007). Para una consecución adecuada de esta reformulación con aceites de origen vegetal y/o marino, es necesario que estos lípidos de nueva incorporación queden bien integrados en el producto y que además, no supongan un deterioro en la percepción organoléptica del mismo.

I.2.5.1. Opciones tecnológicas para la sustitución de la grasa animal

A causa de las diferentes características fisicoquímicas que presentan los aceites de origen vegetal y marino frente a las grasas de origen animal, resulta necesario ajustar las condiciones de procesado para poder obtener el producto cárnico deseado. En la reformulación de productos cárnicos con perfil lipídico mejorado han sido utilizadas tanto grasas en estado sólido como en estado líquido (Jiménez-Colmenero, 2007). La incorporación de estos lípidos se ha realizado de diferentes maneras dependiendo fundamentalmente del producto al que van a ser incorporados. En tal sentido, se han ensayado cuatro maneras diferentes de incorporar aceites de origen vegetal y marino en la reformulación de productos cárnicos: adición de manera directa ya sea líquida o sólida (incluyendo interesterificación), adición como aceites encapsulados y adición como aceites pre-emulsionados.

Incorporación como aceites líquidos

La mayoría de las grasas de origen vegetal y marino se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente e incluso por debajo de temperaturas de refrigeración.

Esto es debido al mayor número de ácidos grasos insaturados que poseen en su composición. Este aumento de la insaturación no solo conlleva una disminución del punto de fusión sino que su susceptibilidad a la oxidación también se vea aumentada. La problemática que deriva de la incorporación de grasas en estado líquido en el procesamiento de productos cárnicos es la posible pérdida del aceite durante el procesamiento y/o cocinado, provocando una pérdida considerable en la calidad del producto final. Dependiendo del tipo de producto, de las características y la cantidad de grasa a añadir, se han estudiado diferentes condiciones a utilizar durante la incorporación. Así, mediante microinyección se ha incorporado aceite de oliva a productos cárnicos cocidos picados y también en los que el músculo cárnico no se ha alterado (Chatzigeorgiou, 2008; Domazakies, 2005). Bloukas *et al.* (1997) concluyeron que la incorporación directa de aceite de oliva en embutido fermentado produjo cambios considerables en la textura y apariencia del producto. La incorporación directa de aceites también se ha estudiado en productos tipo hamburguesa (Dzudie, Kouebou, Essia-Ngang, & Mbofung, 2004; Lowder & Osburn, 2010; Rodríguez-Carpena, Morcuende, & Estevez, 2011) y embutidos curados (Amvrosiadis, 2007; Severini, De Pili, & Baiano, 2003). En sistemas gel/emulsión, la adición directa de aceites resulta más problemática, ya que debe integrarse en la emulsión cárnica (I.2.2). Lurueña-Martínez *et al.* (2004) incorporaron aceite de oliva, a salchichas tipo frankfurt, aumentando su viscosidad al añadirla a bajas temperaturas. Sin embargo, Álvarez *et al.* (2011) no encontraron problemas en la estabilidad de la emulsión al adicionar aceite de canola a salchichas tipo frankfurt.

Incorporación como grasas sólidas

Algunas de las grasas vegetales tienen consistencia sólida a temperatura ambiente debido a su alto contenido en glicéridos, un ejemplo de esto puede ser el aceite de palma. El problema del procesamiento de grasas con altos puntos de fusión es que pueden producirse emulsiones con baja estabilidad debido a la mayor dificultad de picado y dispersión de la grasa (Whiting, 1987); sin embargo, para evitar este tipo de problemas se ha sugerido la adición de estas grasas previamente fundidas (Tan, Aminah, Zhang, & Abdul, 2006). Mediante hidrogenación parcial de grasas vegetales se consigue aumentar el punto de fusión de las mismas (eliminando dobles enlaces), pero mediante este procesamiento también se generan ácidos grasos *trans*, de los que ya se han comentado que presentan implicaciones negativas en la salud (I.1.3.2). Aún así se han utilizado aceites vegetales parcialmente hidrogenados como sustitutos de

grasa animal, para el desarrollo de productos cárnicos tipo hamburguesa (Babji *et al.*, 1998; Liu, Huffman, & Egbert, 1991). Otra tecnología que puede utilizarse para aumentar el punto de fusión de las grasas es la interesterificación, que puede conseguirse bien por métodos químicos o bien por métodos enzimáticos. La gran ventaja de esta tecnología es que permite el aumento del punto de fusión sin la generación de AGS y ácidos grasos *trans*, por lo que puede considerarse una buena alternativa. Diversas grasas vegetales interesterificadas (algodón, palma, oliva, maíz, etc) se han utilizado como sustitutos de grasa para modificar la composición lipídica de distintos embutidos y salchichas tipo frankfurt (Javidipour & Vural, 2002; Ospina, Cruz, Pérez-Álvarez, & Fernández-López, 2010; Vural *et al.*, 2004).

Incorporación como aceites encapsulados

La microencapsulación de aceites además de hacer posible la adición de ciertos tipos de aceites a diferentes alimentos, permite retrasar o incluso inhibir la oxidación lipídica (Kolanowski, Swiderski, & Berger, 1999). Fundamentalmente se ha aplicado esta tecnología para fortificar alimentos de amplio consumo (pan, sopa, zumos, etc.) con AGP n-3, mediante la microencapsulación de aceite de pescado (Garg, Wood, Singh, & Moughan, 2006). El uso de este tipo de tecnología es muy limitado en los productos cárnicos, aunque se han utilizado aceite de pescado y linaza encapsulados como sustitutos de la grasa animal en embutidos curados (Josquin, Linssen, & Houben, 2012; Pelser *et al.*, 2007).

Incorporación como aceites pre-emulsificados

Esta tecnología utiliza la formación de emulsiones de aceite en agua (de grasas vegetales y/o marinas) como ingrediente en la futura emulsión cárnica, de ahí el nombre de pre-emulsión. Generalmente, como emulsificante se utiliza una proteína de origen no cárnico. El problema que radica en la utilización de aceites ricos en ácidos grasos insaturados es su susceptibilidad a la oxidación. La adición directa de antioxidantes a estos aceites muchas veces no da el resultado esperado ya que una vez se dispersan en la matriz alimentaria, el antioxidante migrará del aceite a la fase acuosa del alimento, donde no es tan efectivo en la prevención de la oxidación lipídica (Frankel, 1998). A través de la adición de estos aceites en forma de pre-emulsión, el aceite queda estabilizado en la matriz proteica y se dispersa mejor en alimentos acuosos (como los productos cárnicos), manteniéndose intactos sus sistemas antioxidantes y reduciéndose así las posibilidades de que el aceite se separe de la

estructura del producto cárnico durante los periodos de procesado, conservación y consumo del mismo (Djordjevic, McClements, & Decker, 2004).

Se han ensayado numerosos procedimientos para la producción de pre-emulsiones de aceites (de origen vegetal o marino) que posteriormente se utilizarán como sustitutos de grasa animal en productos cárnicos. Uno de los procedimientos más utilizados se basa en la combinación de diez partes de aceite, ocho de agua y una de aislado de proteína de soja o caseinato sódico como emulsificante proteico (Hoogenkamp, 1989a, 1989b). Atendiendo al emulsificante utilizado, en general, el caseinato de sodio se ha utilizado en productos tipo embutidos cocidos, mientras que el aislado de proteína de soja se ha utilizado en productos fermentados (Jiménez-Colmenero, 2007). Alterando las condiciones de fabricación de la pre-emulsión o variando las proporciones de aceite-agua-emulsificante, se han llevado a cabo otras pre-emulsiones (Bishop, Olson, & Knipe, 1993; Cáceres *et al.*, 2008; Kayaardi & Gok, 2004). El uso de pre-emulsiones como sustitutos de grasa animal se ha realizado en diversos tipos de productos cárnicos (entre ellos salchichas tipo frankfurt y patés), incorporando aceites de origen vegetal (como oliva, maíz, linaza, algodón, etc.) o marino (de algas, de pescado) para la mejora del perfil lipídico del producto final (Ansorena & Astiasaran, 2004; Bishop *et al.*, 1993; Bloukas & Paneras, 1993; Djordjevic *et al.*, 2004; López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2008; Pelser *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2008). La incorporación de grasas mediante el empleo de un único aceite (ya sea de origen vegetal o marino) mejora el perfil lipídico de los productos cárnicos, pero para obtener un perfil lipídico optimizado más en la línea de las recomendaciones nutricionales, se hace necesario utilizar una mezcla de aceites que pueda aportar los diferentes ácidos grasos en las proporciones adecuadas

1.2.5.2. Aceite de oliva

El aceite de oliva es la principal fuente grasa de la denominada “Dieta Mediterránea” (Sánchez-Muniz, 2007), que ha recabado gran reconocimiento e interés internacional como modelo saludable de alimentación (Huang & Sumpio, 2008; Piscopo, 2009). El aceite se extrae del fruto del olivo (*Oliva europaea*) denominado oliva o aceituna. Esta extracción se realiza mediante prensado de la drupa y posterior centrifugado y percolación. Al aceite comestible obtenido sin procesado químico y mezcla alguna se le denomina aceite de oliva virgen, dentro del cual, el aceite de oliva virgen extra es el de más alta calidad, la producción de este tipo de aceite de oliva solo

supone el 10% del total (Boskou, 2006). La composición del aceite de oliva se divide en componentes mayoritarios y minoritarios. Los mayoritarios suponen más del 98% del peso total y son fundamentalmente triacilglicerol, mientras que los minoritarios son más de 230 compuestos químicos, muchos de los cuales poseen capacidad antioxidante (Sánchez-Muniz, 2007). El ácido oleico es el principal ácido graso del aceite de oliva, constituyendo entre el 68-81.5% del total (Ramírez-Tortosa, Granados, & Qiles, 2006). En la **Tabla 6** se puede ver una comparativa de la composición de ácidos grasos del aceite de oliva virgen extra frente a otros aceites y al tocino de cerdo, principal fuente de grasa animal en los productos cárnicos. Una sustitución de tocino de cerdo por aceite de oliva virgen supondría una mejora del perfil lipídico, sobre todo en cuanto a disminución de AGS y aumento de ácidos grasos insaturados, en especial AGM. La mayoría de los componentes minoritarios son casi exclusivos del aceite de oliva virgen, ya que mediante el refinado se pierden una gran parte de los mismos. Tanto el ácido oleico, como algunos polifenoles (tocoferol, hidroxitorisol y oleuropeína), son los componentes del aceite de oliva que pueden ejercer mayores beneficios sobre la salud (Huang & Sumpio, 2008; Sánchez-Muniz, 2007).

Así pues, está ampliamente aceptado que el consumo de aceite de oliva produce una disminución del LDL colesterol cuando se hace en sustitución de AGS (por la alta cantidad de AGM), aporta gran cantidad de antioxidantes y puede reducir el desarrollo de aterosclerosis (Ruiz-Canela & Martínez-González, 2011). Estudios recientes proponen que los beneficios de su consumo van más allá de los mencionados: incrementa el HDL colesterol y la sensibilidad a la insulina, disminuye el daño oxidativo de lípidos y ADN, además de contribuir a disminuir la disfunción endotelial y la presión arterial (Covas, Konstantinidou, & Fito, 2009). Por tanto, no parece extraño que este aceite haya sido muy utilizado en la reformulación de productos cárnicos con perfil lipídico mejorado (I.2.4.1.).

I.2.5.3. Aceite de linaza

El aceite de linaza (o lino) para uso alimentario se obtiene de la presión en frío de la semilla de lino (*Linum usitatissimum*). Estas semillas contienen entre el 26-45% de aceite, principalmente triacilglicerol, pero también gran cantidad de lignanos, considerados compuestos antioxidantes (Nytker, Kymalainen, Gates, & Sjoberg, 2006). Sin embargo, en el aceite de linaza estos lignanos están en muy baja cantidad a no ser que se trate de un aceite de lino rico en lignanos, en el que sobre un aceite de linaza estándar se añaden estas partículas (Morris & Vaisey-Genser, 2003). El principal ácido graso de este aceite es el ácido alfa-linolénico, cuya cantidad está en

torno al 50% del total (Tabla 6). El aceite de linaza se trata de un aceite con una baja cantidad de AGS, moderada cantidad de AGM y elevada cantidad de AGP (Tabla 6). Debido a la alta cantidad de insaturaciones resulta un problema la susceptibilidad a la oxidación del aceite, por lo que se comercializa en botellas opacas y en refrigeración (Morris & Vaisey-Genser, 2003). El ácido alfa-linolénico tiene efectos beneficiosos sobre el contenido del colesterol sérico, disminuyendo tanto el colesterol total como el LDL-colesterol sin afectar los valores de HDL-colesterol (Lunn & Theobald, 2006). Sin embargo, en los estudios clínicos con aceite de linaza solo se ha demostrado una disminución de los triglicéridos a altas dosis (Oomah, 2001). No obstante, sí que se ha estudiado el efecto protector del ácido alfa-linolénico del aceite de linaza frente a enfermedades coronarias, reconociéndose un efecto anti-inflamatorio, reductor de la agregación plaquetaria y de la producción de tromboxanos (Li, Attar-Bashi, & Sinclair, 2003). Por todo ello, el aceite de linaza también ha sido utilizado como ingrediente funcional en algunos productos cárnicos (I.2.4.1.)

Tabla 6. Perfil lipídico (g/100 g) de diferentes aceites y grasas

Ácido graso	Tocino de cerdo	Aceite de oliva virgen	Aceite de linaza	Aceite de pescado
C 14:0	1,1	-	-	11,0
C16:0	18,5	8,7	5,4	26,7
C16:1 n-7	2,4	1,1	-	13,6
C18:0	9,7	1,9	4,0	4,1
C18:1 n-9	29,6	78,7	21,3	12,6
C 18:2 n-6	4,9	8,3	14,5	1,7
C18:3 n-3	0,4	0,9	55,0	-
C20:5 n-3	-	0,03	-	13,8
C22:6 n-3	-	0,05	-	6,8
Total AGS	29,2	10,9	9,4	41,8
Total AGM	32,4	79,8	21,3	27,2
Total AGP	5,3	9,3	69,5	31,0

Fuente: Tocino (Moreiras *et al.*, 2005), aceite de oliva (Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006), linaza y pescado (Hénnon, Kemeny, Recseg, Zwobada, & Kovari, 1999)

I.2.5.4. Aceite de pescado

El aceite de pescado es la principal fuente dietética de AGP n-3. A menudo, este aceite surge como subproducto de la industria pesquera que a través de técnicas de purificación se ha podido adaptar a las demandas sensoriales del consumidor. Estas tecnologías de purificación consisten en la desacidificación (neutralización) para eliminar los ácidos grasos libres, blanqueado para eliminar el color y los productos de oxidación, deodorización para eliminar el sabor y olor a pescado, winterización y/o destilación molecular para aumentar la cantidad de AGP y por último la adición de antioxidantes para prevenir la oxidación (Kolanowski & Laufenberg, 2006). Tras este procesado, la mayoría de los aceites de pescado tienen alrededor de 30 g/100 g de EPA+DHA, pero la cantidad y el tipo de ácidos grasos varía además del tipo de procesado, de la especie de donde se obtenga dicho aceite (Simopoulos, 1991). En la Tabla 6 se observa la composición de este tipo de aceites, destacando la alta cantidad de AGP n-3 de cadena larga pero también de AGS y AGM. La asociación entre el consumo de pescado y riesgo de padecer ECV se ha estudiado extensamente, llegando a resultados inconsistentes pero la mayoría a favor del efecto cardioprotector del consumo de pescado. Parece fuera de toda duda que son los AGP n-3 de cadena larga presentes en el aceite de pescado los responsables de ejercer este efecto beneficioso, pero también parece probable que existan nutrientes en el pescado que sinérgicamente a los ácidos grasos, produzcan este efecto protector (He, 2009). La suplementación con aceite de pescado está asociada con una reducción de muertes por causas cardíacas, pero no con arritmias o muertes generales (León *et al.*, 2008). Las evidencias del consumo de aceite de pescado en intervenciones secundarias parecen ser más fuertes que en las primarias, aunque todavía sigue haciendo falta más estudios que corroboren el efecto protector del consumo de este aceite (Kris-Etherton, Harris, Appel, & Nutr, 2003; Wang *et al.*, 2006). El uso del aceite de pescado para mejorar el perfil lipídico se ha llevado a cabo en diferentes productos cárnicos (I.2.4.1.).

I.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL

El concepto de dieta equilibrada ha sido el adalid principal a la hora de desarrollar las recomendaciones nutricionales encaminadas a prevenir las posibles deficiencias de nutrientes esenciales, así como asegurar un correcto crecimiento, mantenimiento y desarrollo del organismo. Es a mediados del siglo XX cuando se

alude a una nueva definición de salud dada por la WHO en 1948: “La salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades”. Con esta nueva definición, se ponen en juego otros factores que antes no se tenían en cuenta, se da un paso más allá en la relación salud-calidad de vida. En el ámbito de la nutrición, inicialmente se relacionó la dieta con la salud mediante la esencialidad de los nutrientes, es decir, la carencia de ciertos nutrientes provoca enfermedades. Con la nueva definición de salud se intenta abarcar un campo más amplio y no solamente centrado en el carácter esencial de los nutrientes. Tanto la sociedad como la industria se apoyan en este nuevo concepto para demandar unos y desarrollar otros, productos alimentarios que cubran estas necesidades de nutrición óptima, así es como surgen los alimentos funcionales (I.2.). A pesar de las numerosas modificaciones industriales llevadas a cabo con este fin, son pocas las pruebas científicas de que el consumo de un alimento genere un beneficio, identificado y definido, sobre la salud. También se necesitan establecer los criterios de cómo informar al consumidor de este valor añadido del producto, de las alegaciones nutricionales relacionadas con la salud que el alimento puede incluir en su etiquetado.

I.3.1. Biomarcadores en la relación dieta-salud

Una vez se sobrepasa el objetivo nutricional de evitar las enfermedades carenciales, resulta más complejo establecer la relación entre dieta y salud. Será interesante, por lo tanto, tratar de conocer los mecanismos por los cuales el alimento funcional puede modular la función diana y las consecuencias que esto tiene sobre el estado de salud y bienestar y/o sobre la reducción del riesgo de enfermedad. En la **Figura 6** se puede observar los diferentes sucesos a valorar a la hora de establecer la causalidad buscada. Así pues en un primer momento habrá que estudiar el alimento o componente del mismo y al final la valoración del objetivo sobre la salud. Entre ambos puntos se observa la necesidad de comprobar los efectos que el consumo del alimento produce tanto en la función diana como en el desarrollo del proceso de enfermedad. Si se quiere identificar la causalidad de un componente de la dieta relacionado con una enfermedad, se deberán tener en cuenta: la plausibilidad biológica, consistencia en los resultados y, en la medida de lo posible, una relación dosis-respuesta (Olmedilla-Alonso & Granado-Lorencio, 2004). En este ámbito se puede definir plausibilidad biológica como la probabilidad de que, o el punto en el cual, se demuestra un efecto causal entre el alimento (componente) y el alegado efecto fisiológico o psicológico en

humanos, el cual, a su vez, es coherente con los conocimientos biológico previos (Gallagher *et al.*, 2011).



Figura 6. Biomarcadores relevantes en la valoración de los alimentos funcionales, adaptado de Diplock *et al.*(1999)

Para poder valorar los componentes beneficiosos de los alimentos resultaría imposible la realización de ensayos de prevención y curación (objetivos clínicos tradicionales), ya que existen diversos impedimentos: excesivo número de componentes en la dieta, posibles efectos acumulativos, variabilidad de los factores (diferente susceptibilidad de los individuos a la enfermedad, interacciones de los componentes del alimento con el componente a estudio, etc.), etc. Es por ello por lo que resulta esencial la utilización de marcadores biológicos adecuados dentro del proceso de cada enfermedad. Los biomarcadores son utilizados por médicos, científicos y distintos profesionales de la salud para obtener información del paciente o sujeto de estudio, sobre el estado de salud o la respuesta a una intervención. El grupo de trabajo para la definición de biomarcadores (de diversas instituciones y universidades estadounidenses), estableció, en 2001, una serie de definiciones que se recogen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Definiciones relevantes

Biomarcador: Característica que es medida y evaluada objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención. Ej.: colesterol, glucosa en sangre, tamaño del tumor.

Criterio de valoración clínica («clinical endpoint»): Característica o variable que refleja como un paciente (o consumidor) siente, funciona o sobrevive. Ej.: muerte, LDL-colesterol.

Criterio de valoración indirecto («surrogate endpoint»): Biomarcador dirigido a sustituir un criterio de valoración clínica. Se espera que prediga el beneficio clínico (o daño o falta de beneficio o daño) basado en evidencias epidemiológicas, terapéuticas, patofisiológicas o de otra índole científica. Ej.: presión arterial.

Fuente: Atkinson *et al.* (2001)

Los biomarcadores se usan para describir riesgo, exposiciones, efectos intermedios de tratamiento y mecanismos biológicos, como criterios de valoración indirectos (Micheel & Ball, 2010). Es importante tener claras las diferencias entre biomarcadores, criterios de valoración y factores de riesgo. Los biomarcadores son características del paciente o consumidor que son medidas y como tales, están sujetas a parámetros de calidad como precisión, exactitud, viabilidad, reproducibilidad y la necesidad de estándares y controles de calidad. Los factores de riesgo son variables que predicen resultados y están compuestas de biomarcadores y factores sociales y ambientales; serán más valorados aquellos que predigan mejor un evento. Por último, los criterios de valoración (que a menudo incluyen biomarcadores a veces en combinación con eventos clínicos) que van desde algo que el paciente o consumidor claramente experimenta (como la muerte), o una variable en cierto grado relacionada, hasta eventos que impactan en la vida del consumidor o paciente (Micheel & Ball, 2010).

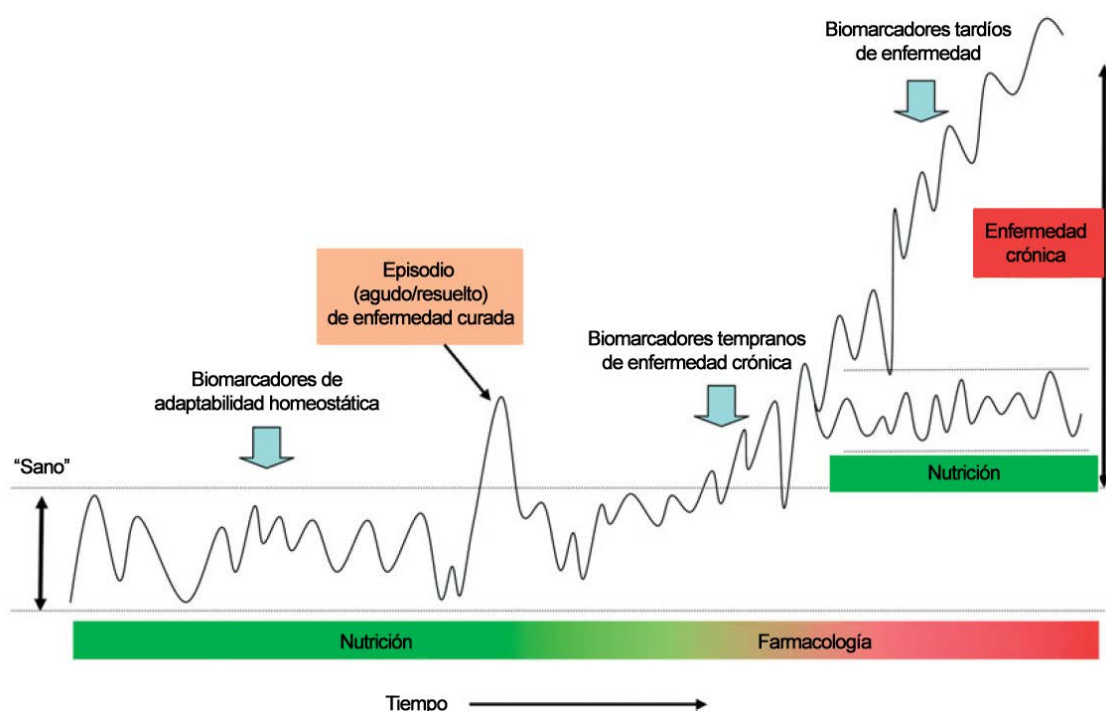


Figura 7. Biomarcadores en relación con la adaptabilidad homeostática (Gallagher *et al.*, 2011)

Existen relativamente pocos biomarcadores y factores de riesgo validados que se apliquen en el contexto de la nutrición y salud. La investigación en nutrición humana tiene el desafío de identificar más biomarcadores relevantes que permitan medir la funcionalidad de los alimentos en el cuerpo humano (Gallagher *et al.*, 2011). En la

Figura 7 se puede observar la importancia que los biomarcadores pueden tener en la detección de enfermedades crónicas así como su utilidad para medir la adaptabilidad homeostática en estudios de intervención.

I.3.1.1. Clasificación de biomarcadores

Los biomarcadores se considerarán factores si están involucrados directamente en el evento (relación causal), sin embargo, si representan eventos correlacionados, deberán considerarse indicadores. Los biomarcadores relevantes para la valoración de alimentos funcionales (Figura 6) se pueden clasificar (Diplock *et al.*, 1999) según se relacionen con:

a) *La exposición al componente del alimento en estudio, valorado en suero, heces, orina o tejidos.* Este tipo de biomarcadores pueden ser indicativos, pero no prueba absoluta, de la biodisponibilidad del componente presente en el alimento. Ej.: aumento de folatos en hematíes como marcador de exposición al folato presente en alimentos.

b) *La función diana o respuesta biológica observada tras la exposición a un constituyente específico de la dieta.* En general sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación celular, metabolismo de sustratos; defensa frente a especies reactivas de oxígeno, sistema cardiovascular, fisiología y función gastrointestinal; funciones fisiológicas y de comportamiento.

c) *Un objetivo intermedio que refleje una mejora en el estado de salud o bienestar o una reducción del riesgo de enfermedad* (valorándolo mediante medidas de fuerza de la asociación causal o de correlación)

Tanto los biomarcadores de exposición como los de respuesta biológica podrán ser considerados factores o indicadores. Sin embargo, los biomarcadores de objetivo intermedio es más probable que sean factores. Los biomarcadores cuanto más cercanos están al criterio de valoración, más específicos serán y será menos probable que estén sujetos a variables de confusión (Diplock *et al.*, 1999).

I.3.1.2. Biomarcadores en la enfermedad cardiovascular

Ya se ha incidido con anterioridad en la importancia de la ECV, sus factores de riesgo y su relación con la dieta (I.1.3.2.). Los procesos etiológicos y marcadores de riesgo de ECV, que previamente han mostrado ser modificables por la dieta son: metabolismo lipídico y lipoproteico, función hemostática, daño oxidativo, metabolismo

de la homocisteína y presión arterial. En la **Tabla 8** se puede observar un pequeño resumen de la relación de algunos biomarcadores con la dieta.

Tabla 8. Biomarcadores de riesgo de enfermedad cardiovascular modificables por la dieta

	Marcadores de Efecto (Función/Riesgo)	Relación con la enfermedad	Componentes de los alimentos relacionados
Metabolismo lipídico y lipoproteico	Colesterol total HDL-colesterol LDL-colesterol Triglicéridos Tamaño de LDL Apolipoproteína B	Elevada: LDL-colesterol	AGS, AGP, AGM, fibra, fitosteroles, proteína de soja, tocotrienoles, tocoferoles, sustitutos de grasa
Función hemostática	Moléculas de adhesión Lp(a) Vasodilatación Ácidos grasos Vitaminas	En población-riesgo Faltan datos a largo plazo	AGP n-3 y trans, ácido linolénico, flavonoides, L-arginina, vitaminas Cy E, γ -tocoferol, alcohol, arginina
Daño oxidativo	Peroxidación lipídica Daño oxidativo del ADN en linfocitos Isoprostanos	Epidemiológica <i>In-vitro</i> <i>Ex-vivo</i>	Vitamina E (α -tocoferol, γ -tocoferol), vitamina C, carotenoides, flavonoides
Metabolismo de la homocisteína	Homocisteína sérica Folatos, B ₆ y B ₁₂ séricos	Elevada: fólico en pacientes con ECV previa	Ácido fólico, vitaminas B ₆ y B ₁₂
Presión arterial		Elevada	Energía total, sodio, potasio, alcohol, grasas, proteína, fibra, café

Fuente: Olmedilla-Alonso, B & Granado-Lorencio, F. (2004)

Quizás el factor de riesgo más estudiado con relación a la ECV ha sido el colesterol sérico y el metabolismo lipoproteico asociado (I.1.3.2.). Si bien es considerado un factor de riesgo de la ECV, el problema surge cuando se utiliza como biomarcador obviando así su inespecificidad, ya que puede ser reducido disminuyendo los niveles de HDL-colesterol y esto no resulta ser nada beneficioso, como ya ha sido señalado. Al igual que el colesterol total también a veces, por su poder predictivo de accidente cardiovascular, se utiliza la relación colesterol total/HDL-colesterol, sobre la cual aún no está claro si una disminución del parámetro mediante un aumento del HDL-colesterol resulta o no beneficiosa. Actualmente está en estudio incluir la terminología de colesterol no HDL (colesterol total menos HDL-colesterol) como factor

de riesgo y objetivo del tratamiento (Micheel & Ball, 2010). En estudios prospectivos se ha observado una relación lineal entre el LDL-colesterol en suero y los índices de mortalidad por ECV. Hay que tener en cuenta también, además de la cantidad de colesterol transportado por las partículas, que la densidad y tamaño de las mismas afectan al riesgo de ECV. Por otra parte, se han encontrado productos derivados de la oxidación del LDL-colesterol (como en la apolipoproteína B) en placas de ateroma de manera proporcional a la concentración de LDL-colesterol en suero (Mensink *et al.*, 2003). En cuanto a las concentraciones de HDL-colesterol se ha observado una relación dosis-respuesta entre el cociente colesterol total/HDL-colesterol y mortalidad total. En estudios prospectivos se asoció la cantidad de triglicéridos en sangre con el riesgo de enfermedad coronaria. Tanto para el HDL-colesterol, como para los triglicéridos, se necesita una mayor evidencia para ser considerados criterios de valoración clínica, como sí ocurre en el caso del LDL-colesterol (Mensink *et al.*, 2003).

Para la función hemostática y el daño oxidativo todavía no se han encontrado marcadores validados. En la hemostasis intervienen diversos factores en continua interacción: endotelio, plaquetas, factores de coagulación y fibrinolíticos. Se ha estudiado cada uno de estos factores por separado, pero existe una clara falta de estudios de intervención que permitan validar a los marcadores. Cuando se produce un desequilibrio metabólico entre sustancias oxidantes y antioxidantes, surge el denominado daño oxidativo. La evidencia de experimentos *in vitro* e *in vivo* sugiere que los antioxidantes de la dieta podrían jugar un papel importante en la prevención de ECV. Sin embargo, resultados contradictorios en estudios de intervención, no permiten establecer una clara conclusión.

La homocisteína es un metabolito intermediario del metabolismo intracelular de la metionina. Parece ser un predictor de mortalidad a largo plazo en pacientes con isquemia coronaria aguda (Olmedilla-Alonso & Granado-Lorencio, 2004). Actualmente, la homocisteína es simplemente un biomarcador relacionado con la ECV, del que no se sabe si una reducción de su concentración afecta al riesgo de padecer ECV o tiene otros efectos positivos sobre la salud (Olmedilla-Alonso & Granado-Lorencio, 2004).

La presión arterial es uno de los factores de riesgo de ECV más importantes modificables por la dieta. Se sabe que es una enfermedad multifactorial donde muchos factores genéticos y ambientales interactúan. Existen evidencias suficientes para afirmar que una disminución de la presión arterial en pacientes hipertensos produce una reducción de la mortalidad y morbilidad cardiovascular (Mensink *et al.*, 2003).

La complejidad y heterogenicidad de los procesos de ECV hace imposible que el uso de un único biomarcador sea suficiente como predictor del desarrollo de la misma, por ello se hace necesario la utilización de más de un biomarcador para

evaluar los procesos de origen y desarrollo de ECV en el contexto de la nutrición. Sin embargo, el LDL-colesterol sí puede ser considerado como uno de los mejores biomarcadores de ECV (Micheel & Ball, 2010).

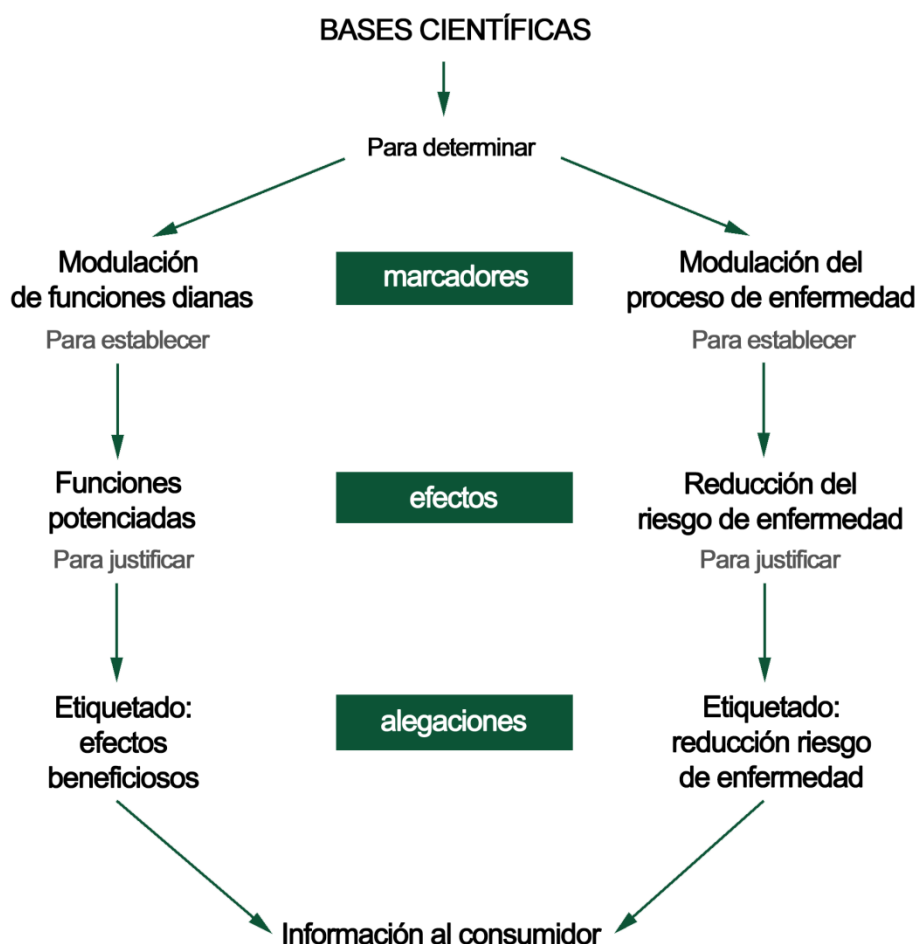


Figura 8. Alimentos funcionales: desde las bases científicas hasta la comunicación al consumidor (Olmedilla-Alonso & Granado-Lorencio, 2004)

1.3.2. Comunicación de los efectos beneficiosos de los alimentos funcionales

En el apartado anterior se ha valorado la relación entre dieta y salud y cómo poder medir los efectos beneficiosos que los alimentos funcionales pudieran producir. Llegados a este punto cabría preguntarse cómo se puede hacer para que estos beneficios de los alimentos funcionales sean también conocidos por los consumidores. Será a través del etiquetado la manera en que el consumidor pueda informarse sobre

los beneficios que el consumo del alimento funcional aporta. Por lo tanto, parece claro, que son las alegaciones sobre salud («health claims») las que cobran gran importancia en la comunicación. De hecho, algunas personas definen a los alimentos funcionales como aquellos que van acompañados de una alegación sobre salud o una declaración de beneficio. El principio fundamental de que cualquier alegación debe ser cierta y no inducir a engaño debe también aplicarse a las alegaciones sobre salud, por lo que éstas deben estar validadas científicamente y ser claras para el consumidor. La clave, sin embargo, es cómo este principio básico debería salvaguardado sin llegar a convertirse en un desincentivo para la producción y desarrollo de alimentos funcionales o para la aceptación de estos productos por los consumidores (Ashwell, 2002). Se necesita tener claro, por lo tanto, que el último objetivo y escalafón en la evaluación de un producto funcional es el de informar al consumidor (**Figura 8**).

1.3.2.1. Alegaciones sobre salud («Health claims»)

Es importante establecer una diferenciación entre los tipos de alegaciones hechas para los alimentos funcionales. En la **Figura 9** se observa una clasificación sencilla. La primera distinción que hay que hacer es entre alegaciones sobre salud y alegaciones medicinales, estas últimas actualmente prohibidas en todo el mundo para productos alimentarios, incluyendo bebidas y suplementos (Ashwell, 2002). Una alegación medicinal implica que el consumo del alimento tiene la propiedad de tratar, prevenir o curar una enfermedad humana, o simplemente hace una referencia a esa propiedad. Una alegación sobre salud es una alegación en el etiquetado de alimentos que anuncia que el consumo de ese alimento conlleva un beneficio específico sobre la salud o reduce el riesgo de contraer enfermedad.

Las alegaciones genéricas están basadas en el conocimiento desde la evidencia de la literatura científica y/o en recomendaciones de entes públicos de salud nacionales e internacionales. Que la alegación sea específica implica que el producto tenga demostrados efectos fisiológicos. Esto requiere que el efecto se produzca cuando el producto sea consumido en cantidades realistas.

Se pueden subdividir ambos tipos de alegaciones en otros dos tipos: de función potenciada y de reducción del riesgo de enfermedad. Las alegaciones de funciones potenciadas conciernen a beneficios específicos de alimentos, nutrientes, componentes o ingredientes en funciones fisiológicas o psicológicas o actividades biológicas, más allá de su establecido rol en el crecimiento, desarrollo y otras funciones normales del cuerpo humano. Las alegaciones de reducción de riesgo de enfermedad indican que el consumo de un alimento, nutriente, componente o

ingrediente puede ayudar a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades (Ashwell, 2002).



Figura 9. Clasificación tipos de alegaciones para alimentos funcionales (Ashwell, 2002)

El nuevo Reglamento Europeo sobre declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos entró en vigor el 19 de Enero de 2007. Esto ha supuesto una reglamentación común en materia de alegaciones saludables en los alimentos. Este Reglamento define alegación sobre la salud o declaración sobre propiedades saludables como «cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud». También se define alegación de reducción del riesgo de enfermedad como «cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana». Ambas definiciones están en consonancia con lo ya explicado en los párrafos superiores. Mediante este reglamento se dividen las alegaciones sobre salud en dos tipos: las que se refieren a reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y salud de los niños; y cualquier otra que no corresponda al grupo anterior. Mediante esta legislación se quiere asegurar un alto nivel de protección de los consumidores, un funcionamiento efectivo del mercado interno de la UE, una justa competición entre la industria alimentaria, además de estimulación y protección a la innovación.

I.3.2.2. Fundamentación científica de las alegaciones sobre salud

Es indispensable que las alegaciones sobre salud estén bien fundamentadas y legisladas. A nivel europeo gracias al trabajo en el proyecto FUFOSSE, la Comisión Europea abordó el tema mediante el proyecto denominado *The Process for Assessment of Scientific Support for Claims on Foods* (PASSCLAIM). Los objetivos del PASSCLAIM son: valoración de las estrategias existentes que permiten evaluar los fundamentos científicos, generar una herramienta genérica que permita evaluar el soporte científico de las alegaciones sobre salud y por último, establecer un criterio para los biomarcadores que pueden ser usados para explorar la relación entre dieta y salud (Aggett *et al.*, 2005). Se recogen en la **Tabla 9** los criterios acordados para la fundamentación científica de las alegaciones.

A la hora de desarrollar un alimento funcional y poder alegar un beneficio sobre la salud o una reducción del riesgo de enfermedad, es muy importante tener en cuenta los criterios de la tabla 9. Dentro de estos criterios la argumentación de las alegaciones es quizás uno de los puntos clave (punto 2, Tabla 9). Existen diferentes categorías de evidencias científicas que pueden fundamentar la alegación, siendo las más fuertes las basadas en resultados de estudios de intervención en humanos, luego tendríamos los estudios observacionales y luego las evidencias de apoyo (estudios en animales, *in vitro*, modelado, genotipado) (Aggett *et al.*, 2005). A la hora de desarrollar un estudio para fundamentar una alegación se recomienda que se parta de una hipótesis clara, basada en el conocimiento previo de otros estudios de intervención y epidemiológicos, pero también de estudios en animales e *in vitro* (Welch *et al.*, 2011). Recientemente, Welch *et al.* (2011) han desarrollado unas guías de cómo diseñar un estudio de intervención de acuerdo al PASSCLAIM, en ellas se definen los factores a tener en cuenta en cada una de las etapas del estudio.

La identificación de los factores de riesgo y la elección de los biomarcadores apropiados es esencial para la fundamentación de las alegaciones. Es necesario conocer la definición que da la EFSA de alegación de reducción del riesgo de enfermedad, en ella no es la reducción del desarrollo de una enfermedad lo que se puede alegar, sino simplemente la reducción de un factor de riesgo para la enfermedad (Gallagher *et al.*, 2011). Lo que resulta complicado es establecer una definición adecuada de lo que es un factor de riesgo para una enfermedad. La definición que da la EFSA es: «un factor de riesgo es un factor asociado con el riesgo de una enfermedad que puede servir como predictor del desarrollo de dicha enfermedad» (EFSA, 2011). En los factores de riesgo fisiológicos establecidos, donde actualmente todos han sido relacionados con enfermedades, se incluyen los

siguientes: elevada presión arterial, elevada concentración de insulina plasmática, elevada concentración de glucosa en ayunas, elevada concentración de colesterol total y LDL-colesterol en sangre, elevada relación LDL-colesterol/HDL-colesterol y pérdida de densidad mineral ósea (Gallagher *et al.*, 2011).

Tabla 9. Criterios PASSCLAIM para la fundamentación científica de las alegaciones (Aggett *et al.*, 2005)

1. El alimento o componente del alimento al cual se le atribuye el efecto alegado debe estar caracterizado.
2. La argumentación de las alegaciones debe estar basada en datos de estudios en humanos, especialmente en estudios de intervención cuyo diseño debe seguir las siguientes consideraciones:
 - a) Los grupos de estudio deben ser representativos del grupo diana
 - b) Se necesitan controles adecuados
 - c) La duración de la exposición y el seguimiento deben ser adecuados para demostrar el efecto buscado
 - d) Se debe caracterizar la dieta base y otros aspectos relevantes del grupo de estudio
 - e) La cantidad ensayada de alimento o componente del alimento debe ser consistente con el patrón de consumo deseado
 - f) Hay que tener en cuenta la influencia de la matriz alimentaria y el contexto dietético en el efecto funcional del componente
 - g) Es necesario monitorizar la adecuación del sujeto en cuanto a ingesta del alimento o componente del mismo durante el estudio
 - h) Capacidad estadística para evaluar la hipótesis
3. Cuando el verdadero criterio de valoración del efecto alegado no pueda medirse directamente, los estudios deberán emplear marcadores.
4. Los marcadores deben ser:
 - biológicamente válidos en cuanto que existe una relación conocida con el resultado final y su variabilidad es conocida dentro de la población diana;
 - metodológicamente válidos con respecto a sus características analíticas
5. Dentro de un estudio, la variable objetivo puede cambiar significativamente y este cambio deberá ser biológicamente relevante para el grupo diana y consistente con la alegación que pretende sustentar
6. Una alegación deberá ser fundamentada científicamente teniendo en cuenta la totalidad de los datos disponibles y valorando la evidencia.

Puede ser útil para fundamentar la alegación dividir el grado de evidencia en diferentes categorías, las cuales serían: convincente, probable, posible e insuficiente (Asp & Bryngelsson, 2008). Esta clasificación ha mostrado ser útil en las diferentes evaluaciones científicas, así organismos internacionales como WHO y WCRF las han usado para justificar las metas poblacionales y las recomendaciones personales (Gallagher *et al.*, 2011), y organismos europeos como la EFSA las utiliza en su opinión

científica para establecer sus guías dietéticas basadas en la alimentación (EFSA, 2010).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente memoria consiste en el diseño y desarrollo de productos cárnicos (con un contenido lipídico mejorado), así como la evaluación de las propiedades saludables asociadas a su consumo (efecto funcional en sujetos con factor de riesgo cardiovascular). Para ello se ha diseñado una estrategia de optimización de la composición de los productos cárnicos basada en la sustitución de la grasa animal habitualmente presente en los mismos, por una combinación de aceites de origen vegetal (oliva y linaza) y marino (pescado). Tal estrategia se plantea a dos niveles, reducción de la presencia de grasa y/o energía y mejora del perfil lipídico, disminuyendo la proporción de AGS y favoreciendo la de AGP, además de mejorar la relación AGP n-6/n-3 y AGP/AGS. Todo ello encaminado a dotar a los productos reformulados de efectos potencialmente funcionales.

Este tipo de desarrollo conlleva un notable reto tecnológico, ya que los productos reformulados han de poseer propiedades y características similares a las que habitualmente muestran los derivados cárnicos convencionales. El diseño además, plantea la necesidad de establecer un equilibrio en las nuevas formulaciones a nivel lipídico, para asegurar que tras limitar sus niveles de energía y grasa fundamentalmente saturada, las nuevas formulaciones, de acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1924/2006, contengan en cantidad suficiente el compuesto o compuestos que se desea testar.

Para llevar a cabo este objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

1. Desarrollo de productos cárnicos (salchichas tipo frankfurt y patés) con el perfil lipídico optimizado. En este marco el objetivo ha consistido en la realización de procesos de reformulación basados en la sustitución de grasa animal por una combinación de aceites de origen vegetal (oliva y linaza) y marino (pescado), encaminados a la obtención de productos más saludables con adecuada viabilidad tecnológica, sensorial y microbiológica. Para abordar tal objetivo, en primer lugar se llevaron a cabo estudios dirigidos al diseño y obtención de un sistema (emulsiones de aceite-en-agua) capaz de vehiculizar de manera conveniente la combinación de aceites y ser empleado como un ingrediente más en la formulación de los productos

cárnicos. Previamente, la combinación de aceites empleada fue específicamente establecida para contribuir a dotar a los productos en los que se incorpora, de un perfil lipídico optimizado de acuerdo a las recomendaciones nutricionales (WHO, 2003; EFSA, 2010). Como modelos de desarrollo se seleccionaron dos tipos de productos (salchichas tipo frankfurt y patés), de notable grado de aceptación. Tal propuesta pretendía por un lado establecer la validez de la estrategia de reformulación en distintas matrices cárnicas y por otro dotar de la variedad necesaria (a nivel de productos) al posterior estudio de intervención.

2. Evaluación del efecto funcional de los productos reformulados (salchichas tipo frankfurt y patés) con el perfil lipídico optimizado. En tal sentido, el objetivo ha consistido en el diseño y realización de un estudio de intervención en humanos encaminado a evaluar el efecto del consumo de estos productos cárnicos previamente desarrollados sobre niveles de colesterol y lipoproteínas séricas, así como sobre diversos índices de riesgo cardiovascular en sujetos con factores de riesgo para esta enfermedad. El estudio se llevó a cabo con un diseño cruzado, controlado y no aleatorizado, de 5 meses de duración, en sujetos con diversos factores de riesgo cardiovascular. Como control se emplearon productos cárnicos (salchichas tipo frankfurt y patés) de características similares a los comerciales convencionales, con niveles de grasa del 18% y 30%, respectivamente, frente al contenido del 15% de las nuevas formulaciones diseñadas específicamente para este estudio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para una mejor comprensión de la metodología empleada, y evitar las repeticiones de los numerosos aspectos descritos en las publicaciones, en esta sección se expondrán de manera esquematizada y resumida los materiales y métodos empleados en el desarrollo experimental, **Figura 1**.

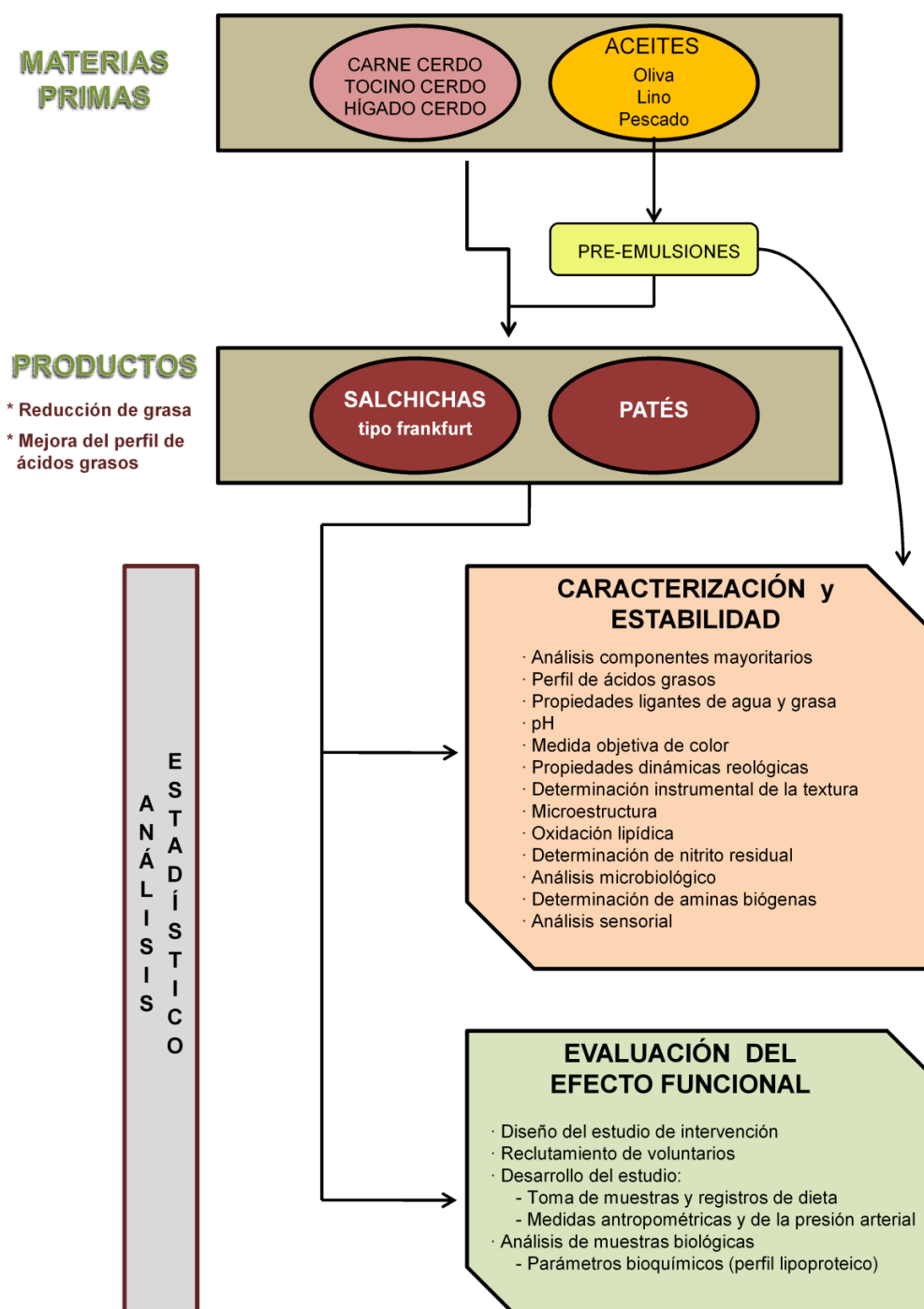


Figura 1. Diseño y planteamiento general del trabajo realizado

III.1. MATERIAS PRIMAS

III.1.1. Materia prima animal

Para la elaboración de los diferentes productos cárnicos (salchichas tipo frankfurt y patés) se empleó **carne magra de cerdo y tocino de cerdo** que se adquirieron durante todo el estudio en un mercado local de Madrid. Manualmente se eliminó la grasa superficial de la carne magra y junto con el tocino se sometieron a un picado a 0.45 cm en una picadora (Mainca, Granollers, España) y se dividieron en lotes que se envasaron al vacío en bolsas de plástico (Cryovac BB3050), para ser almacenados en cámara de congelación (-20 ± 2 °C) hasta su utilización.

Para la producción de patés se utilizó también **hígado de cerdo** adquirido en un mercado local y almacenado en congelación (-20 ± 2 °C) hasta su uso. En el caso de la producción de patés, el tocino de cerdo no se picó sino que se troceó en bloques y se envasó al vacío en bolsas de plástico antes de ser almacenado en congelación (-20 ± 2 °C).

III.1.2. Aceites

Para la reformulación de los productos cárnicos se utilizó una combinación de tres tipos de aceite como fuente de grasa no cárnica. Se usó **aceite de oliva** virgen extra (Carbonell, SOS Cuétara SA, Madrid, España), **aceite de linaza** (Natursoy SL, Casterçol, España) y **aceite** deodorizado **de pescado** (Omevital 18/12 TG Gold, Cognis GmbH, Illertissen, Alemania) con un contenido mínimo de 160 mg de EPA/g y 115 mg DHA/g. La incorporación de los aceites en las salchichas y los patés se realizó en forma de una emulsión de aceite en agua (**pre-emulsión**) de la mezcla **de aceites**. Esta mixtura contenía una proporción del 44,39%, 37,87% y 17,74% de los aceites de oliva, linaza y pescado, respectivamente. Para la estabilización de la emulsión se utilizó caseinato sódico con un 86,4% de proteína (Julio Criado Gómez SA, Alcorcón, España), aislado de proteína de soja (APS) con un 92,1% de proteína (Vicoprot, Trades SA, Barcelona, España) y transglutaminasa microbiana (ACTIVA WM, Ajinomoto Europe Sales, Hamburg, Alemania). Una descripción más detallada de la preparación de las diferentes pre-emulsiones se encuentra en el apartado IV.1. En la **Figura 2** se describe a modo de ejemplo un esquema de la preparación de la pre-emulsión formulada con APS.

III.1.3. Otros ingredientes

En la elaboración de los productos se utilizó cloruro sódico, tripolifosfato sódico, nitrito sódico, ascorbato sódico, saborizantes y leche en polvo. También se usó **gel de konjac** en el desarrollo de algunos patés. Para la fabricación del gel de konjac se utilizó harina de konjac (83% de glucomanano, 120 mesh, Trades SA, Barcelona, España), ι-carragenato (Secolata IP Hispanagar, Burgos, España), almidón de maíz pre-gelificado (Amigel, Julio Criado Gómez SA, Alcorcón, España) e hidróxido cálcico (Panreac Química SA, Barcelona, España). La preparación de este gel de konjac se realizó según lo descrito en Jiménez-Colmenero *et al.* (2010a). Brevemente, en un homogeneizador (Horbat N-506, Horbat Corporation, Troy, OH, EEUU) la harina de konjac se mezcló con agua durante 5 minutos; se añadió después el ι-carragenato para ser todo homogeneizado durante otros 3 min. A la mezcla anterior se adicionó una disolución de almidón de maíz pre-gelificado en agua. La mezcla se enfrió hasta los 10 °C y se añadió una solución de hidróxido cálcico (1%) agitando vigorosamente a temperatura ambiente. Se vació la mezcla sobre un contenedor adecuado y se dejó gelificar a 2 °C hasta su posterior uso.

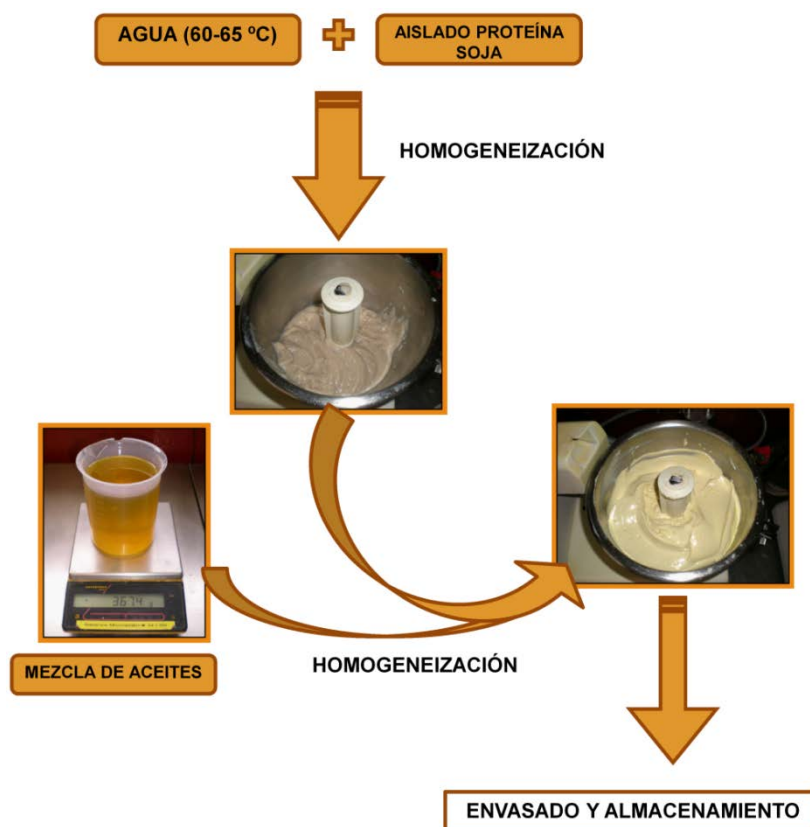


Figura 2. Esquema de la preparación de la pre-emulsión con APS

III.2. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS

III.2.1. Salchichas tipo frankfurt

En primer lugar tanto la carne de cerdo como el tocino (previamente picados, III.1.1.) se descongelaron durante unas 18 h a $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ hasta alcanzar una temperatura entre -1 y $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación se sometieron a picado y homogeneización en una picadora-homogeneizadora refrigerada a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Stephan Universal Machine UM5, Stephan u. Söhne, Hamlen, Alemania). La incorporación de los diferentes ingredientes se realizó en el siguiente orden: en primer lugar se homogeneizó la carne durante un minuto, se adicionaron la mitad de los ingredientes (incluida la grasa, agua y aditivos) y mezclaron durante otro minuto, se terminó de añadir el resto de ingredientes y mezcló durante otro minuto, para terminar con dos minutos más de mezcla en condiciones de vacío. Por lo tanto, el tiempo total de homogeneización se fijó en cinco minutos asegurándose de que la temperatura final de la masa siempre estuviera por debajo de los $14\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. La mezcla cárnica así obtenida se trasvasó a una embutidora manual (Mainca, Barcelona, España) y se incluyó en tripas de celulosa de 20 mm de diámetro (Viscase SA, Bagnold Cedex, Francia). Las salchichas fueron sometidas a tratamiento térmico en un horno ahumador (modelo Unimatic 1000, Micro 40, Eller, Merano, Italia) hasta alcanzar $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el centro térmico. Una vez terminado el proceso térmico se sacaron las salchichas del horno ahumador y se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, después fueron almacenadas en refrigeración ($2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) durante 14 h. Pasado este tiempo se eliminaron las tripas y las salchichas fueron envasadas en bolsas (Cryovac BB3050) a vacío y se conservaron en refrigeración ($2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) hasta su posterior análisis. Un esquema del proceso de elaboración de las salchichas se incluye en la **Figura 3**.

III.2.2. Patés

En primer lugar tanto la carne de cerdo (previamente picada), el tocino (previamente troceado) (III.1.1.) y los filetes de hígado de cerdo se descongelaron durante unas 18 h a $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ hasta alcanzar una temperatura entre -1 y $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La carne de cerdo y la grasa utilizada se sometieron a calentamiento en baño de agua a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30-35 minutos y el agua a añadir se calentó hasta alcanzar los $60\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mientras tanto, el hígado se sometió a picado y homogeneización en una picadora-homogeneizadora (Stephan Universal Machine UM5, Stephan u. Söhne, Hamlen,

Alemania) durante un minuto. Se añadieron los ingredientes/aditivos (exceptuando la grasa y el agua) y el konjac (en el caso de los patés formulados con dicha ingrediente) y se mezcló todo durante otro minuto más. Se adicionó la carne caliente y se homogeneizó durante otro minuto. Después se añadió la grasa caliente y se mezcló todo durante un minuto. Por último se añadió el agua caliente y el resultado se homogeneizó durante un minuto más. Posteriormente se sometió la masa a un picado durante dos minutos en condiciones de vacío y el resultado se envasó en recipientes de plástico (11.5 cm altura, 2.7 cm diámetro) para los trabajos experimentales de los apartados IV.4, IV.5 y IV.6 y para la fabricación de paté en el caso del apartado IV.7 se envasaron en recipientes para 250 g de producto. Una vez envasados se sometieron a tratamiento térmico hasta alcanzar los 80 °C en el centro térmico. Se enfriaron con agua fría y hielo y se almacenaron en refrigeración ($2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) hasta su posterior uso. En la figura 4 se puede observar un esquema del proceso de elaboración del paté.

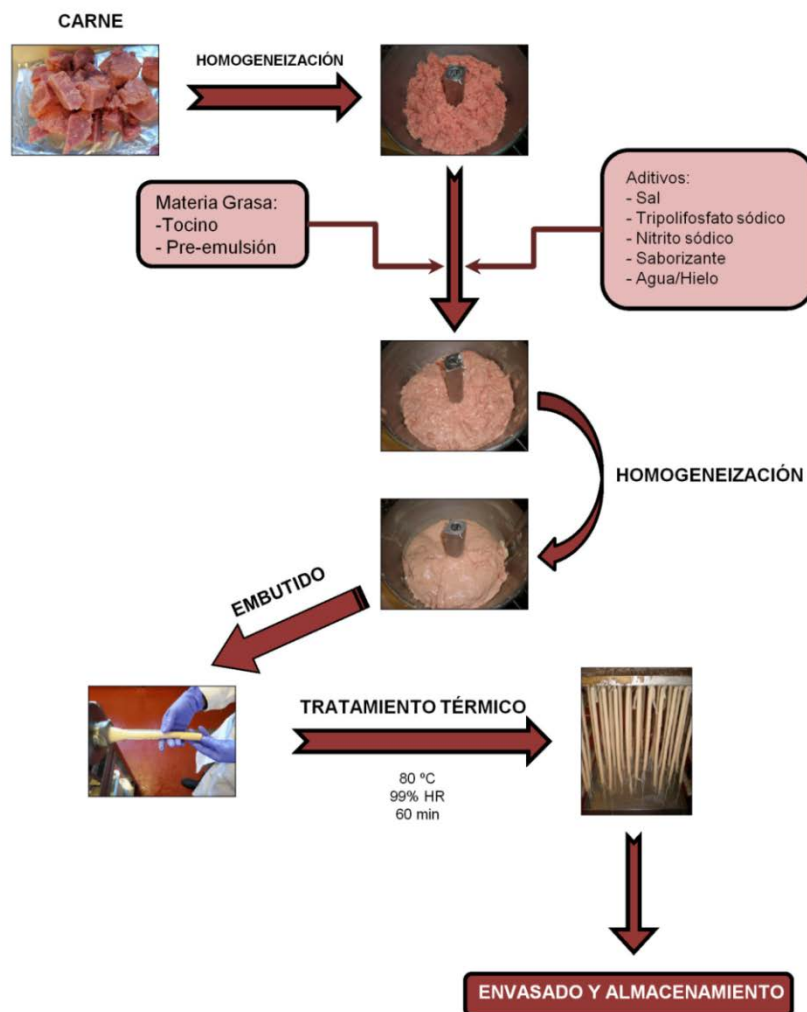


Figura 3. Proceso de elaboración de salchichas tipo frankfurt

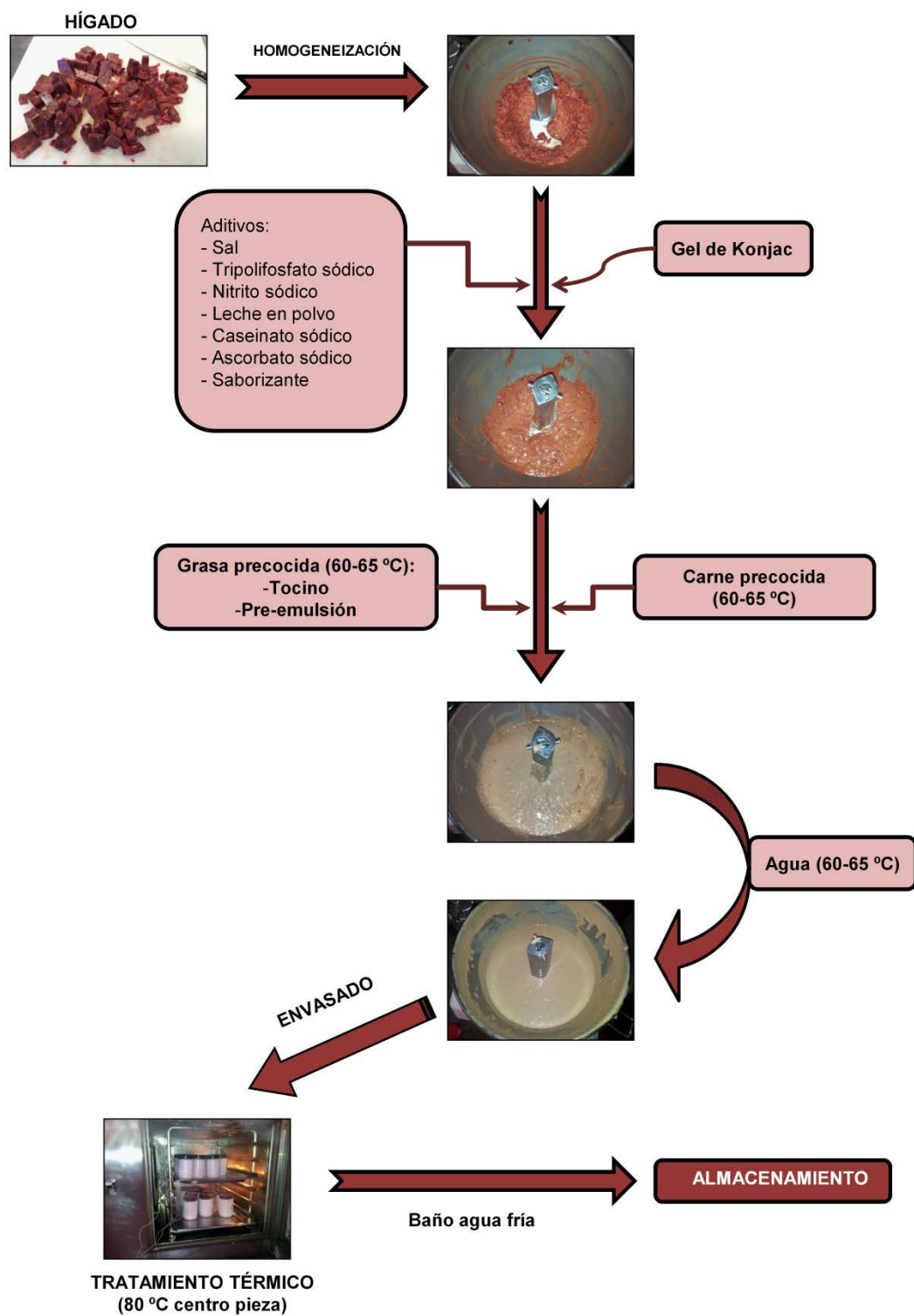


Figura 4. Proceso de elaboración de patés

III.3. CARACTERIZACIÓN Y MEDIDAS DE LA ESTABILIDAD DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

La viabilidad tecnológica, sensorial y microbiológica de los productos se evaluó en base a distintas propiedades. Para ello se realizó una caracterización de las salchichas y los patés, incluyendo la medida de los parámetros más adecuados para este tipo de productos. También se midió su estabilidad a lo largo de la conservación en refrigeración. Se llevó a cabo un análisis sensorial para determinar, entre otras cosas, la aceptación de los productos entre los consumidores.

III.3.1. Componentes mayoritarios

La determinación de humedad y cenizas se realizó según lo descrito por la AOAC (2000). La cantidad de proteína se evaluó mediante un analizador automático de nitrógeno (LECO FP-2000, Leco Corporation, St Joseph, MI, EEUU) tras multiplicar al nitrógeno obtenido por el factor de conversión de 6,25. El contenido en grasa se determinó extrayendo los cárnicos con una mezcla cloroformo/metanol siguiendo el método descrito por Bligh y Dyer (1959).

El contenido energético fue estimado tanto en salchichas como en patés utilizando los factores de conversión de 9,1 kcal/g para la grasa y 4,1 kcal/g para la proteína e hidratos de carbono.

III.3.2. Perfil de ácidos grasos

Para la determinación de los ácidos grasos se siguió el método descrito por López-López et al. (2009). La derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos se realizó con trifluoruro de boro en metanol. Posteriormente se separaron y cuantificaron en un cromatógrafo de gases Shimadzu (Modelo GC-2014, Kyoto, Japón) equipado con una columna capilar SP-2330 (60 m x 0,25 mm x 0,2 µm) (Supelco, Inc, Bellefonte, EEUU) y un detector de ionización de llama. Las temperaturas del inyector y detector fueron 250 °C y 260 °C respectivamente. La separación cromatográfica se inició durante 5 minutos a 140 °C elevando la temperatura del horno hasta los 240 °C a razón de 4 °C/min, temperatura en la que se mantuvo durante 20 minutos. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados por comparación con una mezcla estándar de ésteres metílicos (Supelco, Alltech Associated, Inc. Deerfield, IL, EEUU).

III.3.3. Propiedades ligantes de agua y grasa

Se midieron pérdidas de peso (grasa y agua) de cada producto y en función del tratamiento ensayado (térmico, procesado, conservación).

III.3.3.1. Estabilidad de la emulsión. Pérdidas por cocción

Se determinó la estabilidad de la emulsión tanto en las matrices cárnicas como en las pre-emulsiones, resultado del calentamiento de las mismas durante 30 min en baño de agua a 70 °C y posterior medida de las pérdidas de fluido sufridas. Para los patés se evaluó la estabilidad de la emulsión, midiendo las pérdidas por cocción (*cooking loss*), y el rendimiento del proceso (*cooking yield*). Se determinaron los siguientes parámetros:

- Fluido total liberado (Total Fluid Released, TFR): Porcentaje de fluido liberado tras el calentamiento expresado con respecto al peso inicial de la muestra.
- Agua liberada (Water Released, WR): Determinado tras el calentamiento del TFR a 105 °C durante 16 h, expresándose también como porcentaje respecto al peso inicial de la muestra.
- Grasa liberada (Fat Released, FR): Calculada como diferencia de TFR y WR.
- Rendimiento de la cocción (*cooking yield*, CY): Calculado en porcentaje como el peso de la muestra tras la cocción respecto al peso inicial.

III.3.3.2. Pérdidas durante el procesado

Las pérdidas del procesado (*Processing Loss*) se calcularon para las salchichas tipo frankfurt como la suma de las pérdidas de peso durante el tratamiento térmico y el almacenamiento en refrigeración durante la primera noche.

III.3.3.3. Pérdidas durante la conservación

Se determinaron las pérdidas de peso durante la conservación en refrigeración (*Purge Loss*, PL) para salchichas y patés. Cada día de análisis se eliminó el envase y se secó el producto superficialmente, se pesó una vez atemperado y se calculó la PL por diferencia de pesada que se expresó como porcentaje del peso inicial.

En las pre-emulsiones también se determinó la estabilidad (*Creamy Stability*) mediante la separación de las fases acaecida durante su conservación en refrigeración.

III.3.4. pH

Se determinó en un pH-metro 827 Metrohm (Metrohm AG, Suiza) el pH de cada uno de los productos después de mezclar 10 g de muestra con 100 ml de agua destilada.

III.3.5. Medida objetiva del color

La evaluación del color se determinó sobre la superficie del corte transversal de pre-emulsiones, salchichas y patés. La estimación objetiva del color se realizó por el método de reflectancia mediante el sistema de coordenadas CIELab (CIE, 1978; CIE, 1995, Young and Whittle, 1985) en un colorímetro CR-400 Chroma Meter (Konika Minolta Business Technologies, Inc, Tokio, Japón). Se determinaron los parámetros L^* , a^* y b^* , donde L^* representa la luminosidad (donde 0 es negro y 100 blanco), a^* la tendencia al rojo (donde -60 es verde y +60 rojo) y b^* la tendencia al amarillo (donde -60 es azul y +60 amarillo).

III.3.6. Propiedades reológicas dinámicas

La evaluación reológica de pre-emulsiones y de masa cárnica en patés, fue llevada a cabo en un reómetro de esfuerzo controlado Bohlin CVO-100 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, Reino Unido). Todas las medidas fueron realizadas a 25 °C usando placas paralelas (20 mm diámetro, 1 mm abertura) cubiertas con una pequeña capa de vaselina (Codex purissimum, Panreac Química S. A. Barcelona, España) para impedir la pérdida de humedad. El control de temperatura se llevó a cabo mediante un sistema Peltier (-40 to +180 °C; Bohlin Instruments, Gloucestershire, Reino Unido). La región lineal viscoelástica se determinó para cada muestra a través de barridos de esfuerzo a 0,16 Hz. Después, se realizó un barrido de frecuencia aplicando un esfuerzo predeterminado (entre 0,1 y 10 Hz) para cada muestra. Cuando se realizó barrido de temperatura calentando desde los 10 °C hasta los 90 °C a un ritmo de 1 °C/min, se utilizó una frecuencia de 0,1 Hz y una compresión del 0,5%. Los parámetros módulo complejo (G^* Pa), módulo de pérdida (G'' Pa) y ángulo de fase (δ°) se determinaron usando el software informático del equipo.

III.3.7. Determinación instrumental de la textura: penetrometría y TPA

Para la evaluación de la textura de las pre-emulsiones, patés y salchichas se empleó un texturómetro TA-XT.Plus (Texture Technologies Corp. Scarsdale, NY, EEUU). En el caso de pre-emulsiones y patés se utilizó un ensayo de penetración, mientras que para las salchichas tipo frankfurt un ensayo de perfil de textura. Pese a que el perfil de textura reporta datos más completos, el motivo para la selección de un ensayo y otro radicó en la propia textura de los productos a analizar, dada la imposibilidad aplicarlo a productos con una estructura menos sólida que la de las salchichas. Debido a su untuosidad y viscosidad, el ensayo de penetración se consideró el más adecuado para las pre-emulsiones y los patés.

III.3.7.1. Ensayo de penetración

La medida instrumental de la textura mediante el ensayo de penetración se basó en el procedimiento descrito por Carballo *et al.* (1996). La medición se llevó a cabo sobre las muestras dentro de sus correspondientes recipientes de plástico y a temperatura ambiente. Se utilizó un émbolo de acero inoxidable de 6 mm de diámetro sujeto a una célula de carga de 5 kN. Se generaron las correspondientes curvas fuerza-penetración y se analizaron diferentes parámetros: distancia al punto de ruptura de gel (*distance*, D, mm) como indicador de la elasticidad; pendiente de la curva de fuerza-deformación (*slope*, S, adimensional); fuerza de penetración (*penetration force*, PF, N) como fuerza ejercida en el punto de ruptura de gel; y la fuerza de gel (*gel strength*, GS, N/mm), definida como el área bajo la curva de fuerza-deformación.

III.3.7.2. Ensayo de Perfil de Textura Instrumental (*Texture Profile Analysis*, TPA)

Este ensayo se basó en el procedimiento descrito por Bourne (1978) que consiste en una doble compresión axial de la muestra (en este caso salchichas) sin llegar a romperla, imitando el comportamiento mecánico de la masticación. Se cortaron las salchichas (22 mm de diámetro) en porciones de 20 mm y se sometieron a doble compresión hasta un 40% de su altura original. Se utilizó una célula de carga de 5 kN y se aplicó una velocidad de cabezal de 1 mm/s para obtener las curvas de fuerza-tiempo de deformación (**Figura 5**). Se determinaron los siguientes parámetros:

- Dureza (*Hardness*, N): definida como la altura máxima en el registro obtenido en el primer ciclo de compresión. Este parámetro sirve para evaluar la fuerza máxima necesaria para producir una cierta deformación.

- Cohesividad (*Cohesiveness*, adimensional): calculada como la relación entre el área positiva de la primera y segunda compresión.
- Elasticidad (*Springiness*, mm): corresponde a la altura recuperada por la muestra tras la primera compresión.
- Masticabilidad (*Chewiness*, Nxmm): calculada como el producto de dureza, elasticidad y cohesividad.

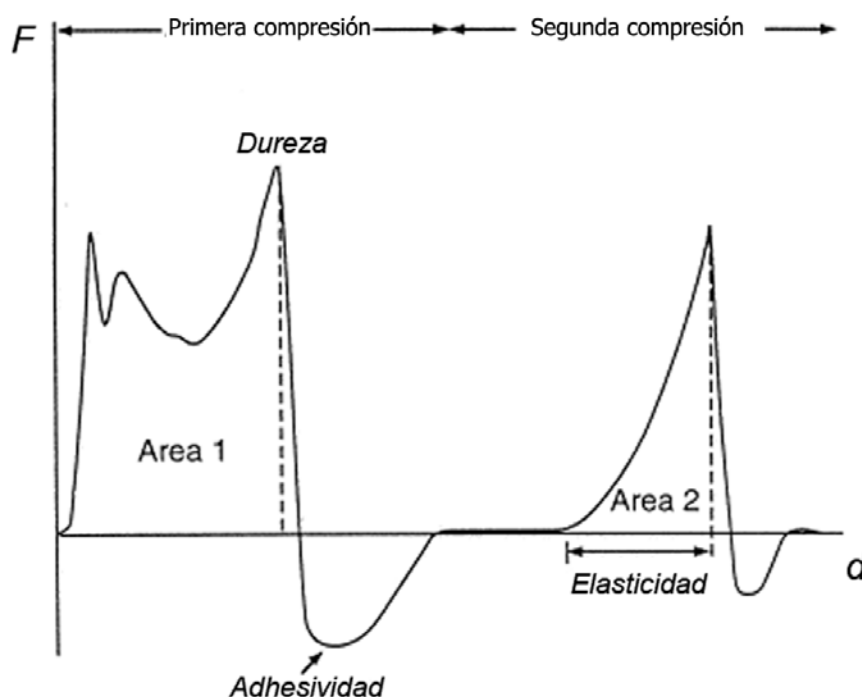


Figura 5. Curva típica del análisis de perfil de textura

III.3.8. Microestructura

Se determinó la microestructura de las salchichas tipo frankfurt y de las pre-emulsiones mediante microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) siguiendo la metodología propuesta por Jiménez-Colmenero *et al.* (1995). Las muestras se fijaron con una mezcla (1:1 v/v) de p-formaldehído (4%) y glutaraldehído (0,2%) en 0,1 M tampón fosfato (pH 7,2), postfijadas con OsO_4 , lavadas, deshidratadas con concentraciones crecientes de acetona, desecadas hasta el punto crítico, sometidas a un sombreado metálico con oro/paladio y se analizaron en el SEM (Jeol, JSC 6400, Tokyo, Japón) a una tensión de 20 kV. Se tomaron fotografías a distintos aumentos para seleccionar las más representativas. El estudio

microscópico fue realizado en el Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid.

III.3.9. Oxidación lipídica

La velocidad y extensión de la oxidación lipídica experimentada por las salchichas y patés se midió mediante el ensayo de las sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico o TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*), determinándose las sustancias que reaccionan con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido. Para el caso de las salchichas se siguió la metodología empleada por Vincke (1970) con algunas modificaciones, para los patés se siguió el método propuesto por Rosmini *et al.* (1996). En ambos casos se realizó una extracción ácida con una solución ácido tricloroacético y posteriormente se añadió ácido 2-tiobarbitúrico 20 mM. La reacción se llevó a cabo en completa oscuridad durante 20 h a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. Se obtuvo una coloración rosa característica que fue medida a 532 nm en un espectrofotómetro (Lambda 15UV/VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer, EEUU). Se determinó una curva de calibración con 1,1,3,3-tetraetoxipropano y así expresar los resultados en mg de malonaldehído por kg de muestra.

III.3.10. Determinación de nitrito residual

El contenido de nitrito residual se midió en salchichas tipo frankfurt mediante análisis de inyección de flujo (*Flow Injection Analysis*, FIA) de acuerdo al método propuesto por Ruiz-Capillas *et al.* (2007a). Primero se realizó una extracción de acuerdo al método 973.31 de la AOAC (1990) para poder inyectar el extracto en el FIA, donde se mezcló con cloruro amónico como primer reactivo (el portador) y más tarde con el reactivo de coloración (sulfanilamida). Los resultados se expresaron en mg/kg de muestra.

III.3.11. Estudio microbiológico

Se hicieron recuentos tanto de aerobios totales a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ como de enterobacterias para salchichas y patés. Además, se realizó recuento de bacterias lácticas en salchichas.

Se utilizó el medio de cultivo *Plate Count Agar* (PCA) para el recuento de microorganismos aerobios totales. La incubación se realizó a 30 °C durante 72 h.

Para el recuento de enterobacterias se utilizó el medio de cultivo *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG) incubando a 37°C durante 24 h.

Para la determinación de bacterias acidolácticas se utilizó el medio *De Mann Rogosa Sharp Agar* (MRS) e incubación a 30 °C entre 3 y 5 días.

III.3.12. Determinación de aminos biógenas

Tanto en salchichas como en patés se determinaron las siguientes aminos biógenas: tiramina, feniletilamina, histamina, putrescina, cadaverina, triptamina, agmatina, espermidina y espermina. Para ello se mezcló 25 g de muestra con 50 ml de ácido tricloracético al 7,5%. Posteriormente la mezcla se centrifugó y pasó por filtro Millipore de 0,45 µm y se analizó en un HPLC modelo 1022 (Perkin-Elmer, EEUU) dotado de sistema postcolumna Pickering PCX 3100 (Pickering Laboratories, Mountain View, Ca, EEUU) siguiendo la metodología de Ruiz-Capillas y Moral (2001).

III.3.13. Análisis sensorial

Se realizó una prueba hedónica para determinar las propiedades sensoriales de salchichas y patés. Para la selección de los catadores, se llevaron a cabo diversas sesiones de entrenamiento en las que los panelistas se familiarizaron con los productos y los atributos a medir. Finalmente se eligieron a 15 panelistas para el análisis sensorial de las salchichas tipo frankfurt y 16 panelistas para el de patés. Para cada muestra se evaluaron hedónicamente diferentes parámetros en una escala no estructurada de extremos fijos. Los parámetros evaluados para las salchichas fueron: jugosidad, dureza, sabores extraños, sabor, olor y aceptabilidad general. En el caso de los patés se determinó: sabor, olor, textura, dureza, color, sensación grasa y aceptabilidad general.

III.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL

Una vez discutidos los aspectos del desarrollo y formulación y análisis de los diferentes productos cárnicos, se valoró mediante un estudio de intervención en humanos el efecto potencialmente beneficioso del consumo de los productos cárnicos reformulados con un perfil lipídico optimizado. A continuación se resume su diseño y la sistemática empleada.

III.4.1. Diseño del estudio de intervención

Se llevó a cabo un estudio de intervención cruzado, no aleatorizado y controlado de 5 meses de duración. Se realizó sin aleatorización debido a las dificultades que entrañaba para la planta piloto poder elaborar al mismo tiempo cantidades adecuadas de los diferentes productos. El estudio se dividió en tres periodos en los cuales los voluntarios consumieron 200 g de salchichas tipo frankfurt y 250 g de patés por semana, con diferente contenido en grasa (**Figura 6**). En el primer periodo los participantes consumieron productos cárnicos con un contenido en grasa del 15%, siendo toda la grasa de origen animal. En un segundo periodo consumieron productos también con el 15% de grasa, pero el tocino de cerdo (fuente de grasa habitual de estos productos) fue sustituido por una mezcla de aceites en pre-emulsión (oliva, linaza y pescado, descrita en el apartado III.1.2.). En el último periodo consumieron los productos cárnicos control elaborados con tocino de cerdo como fuente principal de grasa y con un contenido graso del 30% para los patés y 18% en el caso de las salchichas, valores de grasa similares a productos comerciales. Las salchichas diseñadas para la intervención nutricional contenían 15% de grasa a diferencia del 12% de la salchichas desarrolladas en el apartado tecnológico, para así aumentar el consumo de los componentes bioactivos (AGP n-3) hasta una cantidad asociada a efecto beneficioso, sin tener que aumentar la cantidad de salchichas a consumir. Cada uno de estos periodos tuvo una duración de 4 semanas, periodo de tiempo suficiente para inducir cambios estables en el perfil lipídico y de lipoproteínas (Oubiña *et al.*, 2001). Entre periodos hubo un espacio de cuatro semanas (periodo de lavado sin aporte de los productos cárnicos a estudiar) en el que los voluntarios consumieron su dieta habitual, que se consideró suficiente para que el perfil lipídico de los voluntarios volviera a niveles basales (Becker *et al.*, 1999; Jiménez-Colmenero, Sánchez-Muniz *et al.*, 2010). Al principio y final de cada periodo los sujetos acudieron al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, ICTAN, con un registro de la dieta consumida durante los 3 últimos días. Se les extrajo sangre en ayunas (en

la enfermería del CSIC en sus sedes de Ciudad Universitaria) y se realizaron las medidas antropométricas correspondientes. Se midieron como marcadores de riesgo cardiovascular los niveles de colesterol total, HDL y LDL colesterol, triglicéridos (parámetros de uso habitual en la experimentación clínica), así como la concentración de LDL oxidada y algunos índices de aterogenicidad. También se recogieron muestras de sangre y orina para la valoración de arilesterasa, PCR alta sensibilidad, tromboxanos, prostaciclina, glucosa, insulina, Apo I, Apo B, 8-oxo-deoxi-guanosina, isoprostanos y agregación plaquetaria, cuyo estudio está siendo objeto de otra tesis doctoral en curso.

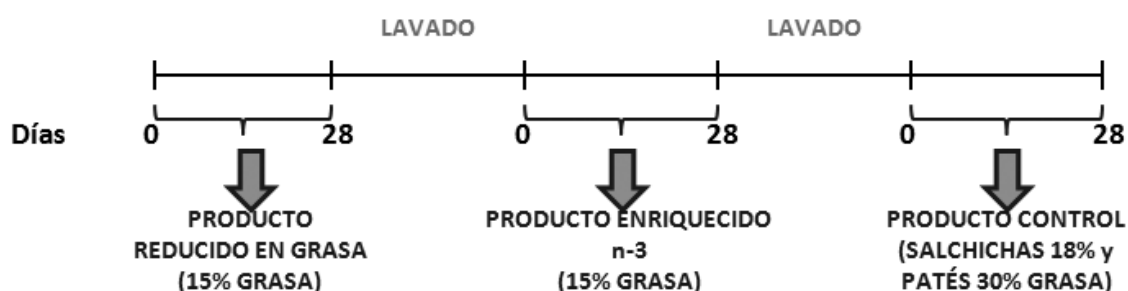


Figura 6. Diseño del estudio de intervención

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó un valor de LDL-colesterol indicativo de alto riesgo de ECV (>130 mg/dl; NHLBI, 2001) y que tras el consumo de los productos reformulados se pueda obtener una disminución por debajo de ese valor crítico de riesgo cardiovascular. Por ello, el cálculo del tamaño muestral se realizó en base un valor medio de 140 mg/dl de LDL-colesterol. Un tamaño muestral de 22 sujetos (desviación estándar igual a 16) es necesario para obtener una diferencia del 10% en el nivel de LDL-colesterol con una potencia del 80% y un nivel de significación del 0,05. Se seleccionaron a 22 sujetos que cumplieron los requisitos de inclusión: nivel de colesterol superior a 200 mg/dl y de LDL-colesterol superior a 110 mg/dl, sobrepeso ($IMC > 25$ kg/m² e $IMC < 34,9$ kg/m²) y que estuvieran dispuestos a consumir 200 g de salchichas tipo frankfurt y 250 g de patés a la semana. Los criterios de exclusión fueron: uso de medicamentos o de alimentos enriquecidos con fitosteroles para el control o reducción del colesterol, hipertensión u obesidad; consumo regular de productos enriquecidos en AGP n-3; e intolerancia alimentaria o alergia a cualquiera de los componentes de los productos cárnicos del estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta del Hierro-Majadahonda (Acta nº261, 20/12/2010) y el

Comité de Bioética del CSIC. Todos los voluntarios firmaron el consentimiento informado después de recibir información oral y escrita sobre el estudio. En los anexos I y II de la presente memoria se encuentran la hoja de información y el modelo de consentimiento informado que se entregó a los voluntarios así como la aprobación por parte del Comité de de Ética para la Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta del Hierro-Majadahonda (Anexo III).

Se acordó determinar las siguientes variables principales y secundarias:

- Variables principales: LDL-colesterol, colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos, LDL-oxidadas, arilesterasa, PCR alta sensibilidad, tromboxanos, prostaciclina todas ellas medidas en sangre. 8-oxo-deoxi-guanosina, isoprostanos medidos en orina. Presión arterial.
- Variables secundarias: glucosa, insulina, Apo I, Apo B y agregación plaquetaria medidas en sangre. Medidas antropométricas: peso, altura, perímetros de cintura y cadera, medida de pliegues subcutáneos (bicipital, tricipital, subescapular y abdominal) y bioimpedanciometría.

III.4.2. Selección de voluntarios

El reclutamiento de voluntarios se llevó a cabo carteles anunciadores en los diferentes centros de investigación que el CSIC tiene en la ciudad, en todo el campus de Ciudad Universitaria de Madrid, en los Ministerios de Trabajo e Inmigración y Sanidad, en diversas sociedades científicas y otras entidades (SEN, Instituto Tomás Pascual, SPRIM, etc.). De las 48 personas que mostraron interés en participar en el estudio, 14 personas no cumplieron alguno de los criterios de inclusión. Del resto de personas interesadas (34) tras recibir información telefónica y por escrito, 8 no volvieron a contestar y 4 decidieron finalmente no participar.

III.4.3. Toma de muestras biológicas, presión arterial y medidas antropométricas

Toma de muestras: los participantes acudieron al ICTAN en seis ocasiones a lo largo del estudio, en ayunas (de 10 h), para la extracción de sangre (aprox. 15 ml) y con una muestra de orina (de 8h). Las muestras de sangre se centrifugación a 2500 g durante 10 minutos. Se recogió el suero y se dividió en alícuotas que fueron almacenadas en distintos crioviales a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ hasta su análisis. Las seis muestras de cada voluntario se analizaron en el mismo día para minimizar la variabilidad

analítica entre días. Se midió la cantidad de orina y se guardó una alícuota de 50 ml en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ para posterior análisis de isoprostanos y 8-oxo-deoxiguanosina.

En cada visita y a cada voluntario después de la extracción de sangre se le realizaron diferentes **medidas antropométricas**: peso, talla, cálculo del IMC, medida de perímetros de cintura y cadera, medida de pliegues subcutáneos (bicipital, tricipital, subescapular y abdominal) y medida de la impedancia bioeléctrica. También se les realizó una **medida de la tensión arterial** sistólica y diastólica con un tensiómetro manual, siguiendo las recomendaciones de WHO (Whitworth, 2003).

III.4.4. Métodos analíticos

En cada muestra se determinó el perfil lipoproteico: colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos mediante el método colorimétrico enzimático específico (Biosystems Colesterol, HDL and LDL Direct, BioSystems Triglycerides Glycerol phosphate oxidase/peroxidase). También se determinó la concentración de glucosa por un método enzimático colorimétrico (Biosystems Glucose oxidase/peroxidase). Los coeficientes de variación inter e intraensayo para colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos fueron 1.9%, 2.0%, 1.3% y 2.6%, y 1.1%, 0.7%, 0.8% y 1.7%, respectivamente.

El grado de oxidación de las LDL (nivel de LDL oxidadas) se determinó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) (Mercodia AB, Uppsala, Sweeden). El análisis implica un doble “ligado” de los anticuerpos del kit, por un lado a la apolipoproteína (Apo) B100 de las LDL y por otro al epitopo oxidado de la misma.

Se calcularon también diferentes índices de riesgo cardiovascular: Índice de atoregenicidad (colesterol total/HDL-colesterol) propuesto por Castelli (1988), la relación LDL-colesterol/HDL-colesterol, y la aterogenicidad del LDL-colesterol calculado mediante la relación molar de triglicéridos/HDL-colesterol (Boizel, Benhamou, Lardi *et al.*, 2000).

III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comprobó la normalidad de los parámetros mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo que todos los datos se ajustaban a una distribución normal.

Para determinar el efecto de la formulación sobre los diferentes parámetros estudiados, se realizó un análisis de la varianza (*Analysis of variance*, ANOVA) de un factor. Se utilizó como contraste no planeado (o *post hoc*) el test de la diferencia honestamente significativa de Tukey (*Honest Significant Difference*, HSD) para determinar las diferencias entre grupos. Para establecer el efecto de la conservación y las formulaciones en los parámetros medidos, se utilizó una ANOVA de dos vías (formulación y tiempo) donde se empleó el test HSD de Tukey para determinar las diferencias. También se utilizó el cálculo de la correlación de Pearson para valorar la posible existencia de una relación lineal entre dos variables.

Todos los niveles basales medidos al inicio de cada periodo del estudio de intervención fueron evaluados mediante Modelo Lineal General (MLG) de medidas repetidas para establecer posibles diferencias entre los mismos. El test t de Student para pruebas pareadas fue utilizado para evaluar los cambios significativos producidos en cada periodo respecto a la línea base. Además, se utilizó un test de medidas repetidas (MLG) seguido de un test de Bonferroni para determinar las diferencias estadísticas entre los periodos en términos de cambios porcentuales relativos. Por último, se llevó a cabo un test de Chi-cuadrado que permitió evaluar los cambios en las prevalencias de los individuos que presentaron alteraciones en los niveles de lípidos, lipoproteínas y tensión arterial.

Para el análisis estadístico de los resultados se emplearon los siguientes programas: Statgraphics Plus 5.1 (STSC Inc. Rockville, MD, EEUU); SPSS Statistics 17.0 y PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc, Chicago, EEUU); e IBM SPSS Statistics vs. 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, EEUU). El nivel de significación quedó establecido en $P < 0,05$ para todos los análisis.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se llevó a cabo en consonancia con el objetivo general establecido, esto es diseñar y desarrollar productos cárnicos con perfil lipídico optimizado y evaluar su efecto funcional en sujetos con varios factores de riesgo cardiovascular. La estrategia utilizada para la reformulación de los productos cárnicos se ha basado en la sustitución de la grasa animal habitualmente presente en los mismos, por una combinación de aceites de oliva, linaza y pescado, estabilizados en forma de emulsión de aceite en agua. Este planteamiento ha supuesto la modificación del contenido lipídico de los productos (salchichas tipo frankfurt y paté) a dos niveles, por un lado la reducción de grasa y por otro la mejora del perfil de ácidos grasos, con la finalidad de proporcionar unos efectos potencialmente funcionales.

En razón de su desarrollo experimental, así como para facilitar la comprensión del esfuerzo investigador llevado a cabo, el trabajo realizado se ha estructurado en dos partes, siguiendo el orden establecido en los objetivos parciales (apartado II).

IV.1. DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS (SALCHICHAS TIPO FRANKFURT Y PATÉS) CON EL PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO

Este apartado agrupa la mayor parte de la experimentación realizada. En una primera fase se llevaron a cabo estudios encaminados a la preparación y caracterización de un sistema (emulsiones de aceite en agua) de estabilización de una combinación de aceites de origen vegetal y marino (previamente establecida en base a su perfil lipídico), para ser incorporada como ingrediente en los productos cárnicos. A continuación, se ensayaron las estrategias de reformulación planteadas sobre dos modelos cárnicos diferentes: salchichas tipo frankfurt y patés, evaluando sus consecuencias sobre aspectos nutricionales, así como sobre su viabilidad tecnológica, sensorial y microbiológica. En consonancia al trabajo realizado y a las publicaciones a que ha dado lugar, este apartado se ha estructurado de la siguiente manera:

IV.1.1. *Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: an approach for development of functional meat products*

IV.1.2. *Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and Technological properties of low-fat frankfurters*

IV.1.3. *Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation*

IV.1.4. *A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté*

IV.1.5. *Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: Dynamic rheological properties and technological behaviour during chill storage*

IV.1.6. *Enriched n-3 PUFA/konjac gel low-fat pork liver pâté: lipid oxidation, microbiological properties and biogenic amine formation during chilling storage*

IV.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL EN HUMANOS DE LOS PRODUCTOS REFORMULADOS (SALCHICHAS TIPO FRANKFURT Y PATÉS) CON EL PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO

En una segunda etapa, y una vez obtenidos los productos reformulados con características convenientes a nivel de composición y atributos de calidad, se llevó a cabo un estudio de intervención en sujetos con factores de riesgo cardiovascular elevados, a fin de evaluar su efecto funcional. Los principales resultados del citado estudio se describen en este apartado.

IV.2.1. *Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk. A placebo-controlled study*

IV.1. DESARROLLO DE PRODUCTOS CÁRNICOS (SALCHICHAS TIPO FRANKFURT Y PATÉS) CON EL PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO

IV.1.1. Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: an approach for development of functional meat products

European Journal of Lipid Science and Technology, 2010, 112, 791-801

Research Article

Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: an approach for development of functional meat products

Gonzalo Delgado-Pando¹, Susana Cofrades¹, Claudia Ruiz-Capillas¹, María Teresa Solas² and Francisco Jiménez-Colmenero¹

¹ Instituto del Frío (CSIC), Ciudad Universitaria, Madrid, Spain

² Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Five protein-stabilized oil-in-water emulsions were prepared using sodium caseinate (O/SC), soy protein isolate (O/SPI), sodium caseinate and microbial transglutaminase (O/SC + MTG), sodium caseinate, microbial transglutaminase and meat slurry (O/SC + MTG + MS) and SPI, sodium caseinate and microbial transglutaminase (O/IPS + SC + MTG); their composition (proximate analysis and fatty acid profile) and physicochemical characteristics were examined. The lipid phase was a combination of healthy fatty acids from olive, linseed and fish oils, containing low proportions (15%) of saturated fatty acids (SFA) and high proportions of monounsaturated fatty acids (MUFA, 47%) and polyunsaturated fatty acids (PUFA, 36%), with a PUFA/SFA ratio >2, and a n-6/n-3 PUFA ratio of 0.4. All the oil-in-water emulsions showed high thermal and creamy stability. Results of penetration test and dynamic rheological properties showed the existence of different types of oil-in-water emulsion structures according to stabilizing system of emulsion. Those structures ranged from concentrate solution-like (stabilized only with SC) (gel strength 0.06 mJ) to gel-like (samples containing MTG) behaviours (gel strength ranged between 3.4 and 6.2 mJ). Morphological differences in the organization of the network structure were observed (by scanning electron microscopy) as functions of the protein system used to stabilize the oil-in-water emulsions.

Keywords: Oil-in-water emulsion / Healthier oil combinations / Fatty acid profile / Physicochemical properties / Microstructure

Received: October 27, 2009; Revised: December 15, 2009; Accepted: January 18, 2010

DOI: 10.1002/ejlt.200900234

1 Introduction

Diet and nutrition are important factors in the promotion and maintenance of good health throughout a person's lifetime. Nutrition is coming to the fore as a major modifiable determinant of chronic disease, with scientific evidence increasingly supporting the view that alterations in diet have strong effects, both positive and negative, on health throughout life [1]. There is growing evidence that dietary fat may play a role in the prevention and treatment of a number of chronic

disorders, particularly coronary heart disease. These findings have prompted the issue of dietary recommendations for optimal intake of total, saturated and unsaturated fatty acids, including the proportion between them [1–3]. Dietary fat intake should constitute between 15 and 30% of total diet energy, saturated fatty acids (SFA) no more than 10%, polyunsaturated fatty acids (PUFA) around 6–10% (n-6, 5–8%; n-3, 1–2%), monounsaturated fatty acids (MUFA) around 10–15%, and less than 1% should be from *trans* fatty acids. It is also recommended to limit cholesterol intake to 300 mg/day [1].

Like other food-related sectors, the meat industry is undergoing major transformations, driven among other things by changes in consumer demands. One of the main trends shaping developments in the consumption of meat derivatives is consumer interest in the possibilities of improving health through diet. Meat-based functional foods are seen as an opportunity to improve their 'image' and address the needs of consumers, as well as to update nutrient dietary

Correspondence: Francisco Jiménez-Colmenero, Instituto del Frío (CSIC). Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain
E-mail: fjimenez@if.csic.es
Fax: +34 91 549 36 27

Abbreviations: MS, meat slurry; MTG, microbial transglutaminase; SC, sodium caseinate; SEM, Scanning electron microscopy; SFA, saturated fatty acids; SPI, soy protein isolate

goals. Because of their importance, lipids are among the bioactive components (functional ingredients) that have received most attention, particularly (in quantitative and qualitative terms) with respect to the development of healthier meat products [4–7].

Reformulation of meat derivatives is one of the strategies that has been studied in order to develop healthier meat products (potential functional foods). Healthier lipid reformulation is generally based on replacement (to a greater or lesser extent) of the animal fat normally present in the product with another fat whose characteristics are more in line with health recommendations: i.e., with smaller proportions of SFA and larger proportions of MUFAs or PUFA (especially long chain n-3 PUFA), better n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios, and if possible cholesterol-free. A variety of non-meat fats of plant (olive, linseed, canola, etc.) and marine (fish and algae) origin have been added to different meat products as partial substitutes for meat fats, mainly pork or beef [7].

Different technology options for animal fat replacement have been assayed for the development of healthier lipid meat products. Because of their physicochemical characteristics, pre-emulsions (oil-in-water emulsions) are a suitable technological option to stabilize the non-meat fats used for incorporation in meat derivatives [7–9]. Pre-emulsions are made prior to meat product manufacture and are added to meat products as fat ingredients. Oil-in-water emulsion technology with a non-meat protein improves the system's fat binding ability, since the oils can be stabilized or immobilized in a protein matrix. This leaves more meat protein available to act in the system and reduces the chances of bulk oil physically separating from the structure of the meat product so that it remains stable throughout the range of environmental conditions that it is likely to encounter during processing, storage and consumption [10]. Besides being physically stable throughout a product's lifetime, oil-in-water emulsions constitute an excellent means of enhancing the oxidative stability of lipids in bulk oils, as additional protective measures such as antioxidants can be used to inhibit lipid oxidation. Also, oil-in-water emulsions are easier to disperse into water-based systems such as muscle foods [10].

A number of procedures have been reported for producing an oil-water emulsion for incorporation in meat derivatives [7]. The most commonly applied is one proposed by Hoogenkamp [11, 12], which has been used in numerous applications [13–16]. Generally, sodium caseinate (SC) has been used as an emulsifier in sausage-type products, whereas soy protein isolate (SPI) has been used in fermented products. Vegetable oils have been used as sources of MUFA and PUFA and marine oils as sources of eicosapentenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids to produce health-promoting fatty acid-enriched meat products [7]. The literature contains information on the characteristics of various different types of oil-in-water emulsions for food applications [17, 18], but their technological properties (stability, gelling ability, etc.)

are considerably affected by variations in different factors, including the combination of ingredients such as oil and emulsifier. As far as the authors are aware, there are no references in the literature explaining the characteristics of the oil-in-water emulsions used for animal fat replacement, especially when healthier lipid combinations (of plant and marine origin) are used. This applies to lipid mixtures so designed that healthier meat products containing them as ingredients present better fatty acid profiles and high enough concentrations of specific beneficial fatty acids to make a serious contribution to recommended intake levels when the food is consumed in normal quantities. One fundamental requirement of the design and reformulation of these products with a view to potential health benefits is to assure that lipid contents and profiles meet recommended nutritional goals. Paneras *et al.* [19] reported the formulation of frankfurters with vegetable oils (olive, cottonseed and soybean) following dietary guidelines for fatty acids.

Oil-in-water emulsions of this type are added to meat products as fat ingredients, and hence their composition and physicochemical characteristics affect different quality properties of the reformulated product [7]. A fuller understanding of their characteristics will therefore facilitate their use, help to elucidate their role in the protein matrix structure and help to improve the quality of meat-based food systems to which they are added. The aim of this experiment was to analyse the fatty acid composition and physicochemical characteristics of oil-in-water emulsions stabilized with various protein systems formulated using SC, SPI, meat protein and microbial transglutaminase. The lipid phase was a combination of olive, linseed and fish oils, specially designed with fatty acids in suitable amounts and proportions for purposes of achieving healthier intake goals.

2 Materials and methods

2.1 Materials and reagents

Lipid sources were: olive oil (Carbonell Virgen Extra, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain), linseed oil (Natursoy S.L., Alimentos Ecológicos, Castellterçol, Spain) and fish oil (Omevital 18/12 TG Gold) from Cognis GmbH, Illertissen, Germany, according to supplier information containing 160 mg EPA/g and 115 mg DHA/g plus a combination of tocopherols as antioxidants. The emulsion was made with: meat (mixture of *M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. gracilis* and *M. adductor*) from a local market, SC 86.4% of protein content (Julio Criado Gómez SA, Alcorcón, Spain), SPI 92.1% of protein concentration (Vicoprot, TRADES S.A., Barcelona, Spain) and microbial transglutaminase (MTG) (ACTIVA WM, Ajinomoto Europe Sales GmbH, Hamburg, Germany). According to supplier information, the enzyme was in a mixture containing 1% transglutaminase and 99%

maltodextrin, with a standard transglutaminase activity of approximately 100 units/g.

2.2 Preparation of oil-in-water emulsions

Five different types of oil-in-water emulsions were formulated (Table 1) and prepared using a homogenizer (Stephan Universal Machine UM5, Hameln, Germany) with a control bath at 5 °C. The lipidic material, which was the same in all cases, consisted of a combination of olive, linseed and fish oils in respective proportions of 44.39, 37.87 and 17.74%. This oil combination was designed to produce a healthier lipid formulation with a small proportion of SFA, large proportions of MUFA and PUFA (including long chain n-3 PUFA) and balanced n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios in line with health recommendations. Although the lipid fatty acids profile as designed constitutes a healthier lipid formulation in itself, when mixed in different proportions with meat raw material (during meat product manufacture) it can help to obtain a meat product with improved fat content in line with dietary recommendations for optimal intake of total, saturated and unsaturated fatty acids, including the proportion between them [1–3].

The oil-in-water stabilized with sodium caseinate (O/SC) was prepared by mixing eight parts of water with one part of SC for 2 min in the Stephan Universal Machine. The mixture was emulsified with 10 parts of the oil combination for another 3 min. The emulsion stabilized with soy protein isolate (O/SPI) was prepared by mixing eight parts of hot water (60–65 °C) with one part of SPI for 2 min in the Stephan Universal Machine. That mixture was then emulsified for a further 3 min with 10 parts of the oil combination. Both oil-in-water emulsions (O/SC and O/SPI) were prepared according to the procedure of Hoogenkamp [11, 12]. They have been used in the manufacture of numerous cooked and fermented meat products [7].

The oil-in-water stabilized with SC and microbial transglutaminase (O/SC + MTG) was prepared in the same way as O/SC but including MTG (Table 1). A meat slurry (MS) was prepared by homogenizing (Omnimixer 2 min) 23.58 g of meat with 608 mL of water (2 °C) for use in preparation of the O/SC + MTG + MS emulsion. This sample was

prepared by mixing eight parts of MS with one part of SC and MTG in the Stephan Universal Machine (Table 1) for 2 min. The mixture was emulsified for a further 3 min with 10 parts of the oil combination. The oil-in-water stabilized with SPI, SC and microbial transglutaminase (O/SPI + SC + MTG) was prepared in the same way as O/SPI but including SC and MTG (Table 1).

The temperature of the emulsions was less than 10 °C (temperature Logger EBI-2T-211, ebro Electronic GmbH & Co.KG, Ingolstadt, Germany) at the end of the process. Each sample was stuffed into plastic tubes (length 11.5 cm, diameter 2.7 cm, weight approximately 56 g) and centrifuged (2500 g, 3 °C, 5 min) (Multifuge 3L-R, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany). The oil-in-water emulsions were stored 24 h at 2° ± 2 °C, before analysis. Each oil-in-water emulsion was prepared in duplicate.

2.3 Proximate analysis and pH

Sample moisture and ash contents were determined [20] in triplicate. Protein content was measured in triplicate with a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA). Fat content was evaluated in triplicate according to Bligh and Dyer [21]. The pH was determined six times using an Orion Research 720A pH meter (Instrumentación Analítica, S.A. Madrid, Spain) on a homogenate of 10 g of sample in 100 mL distilled water.

2.4 Fatty acid profile

Fatty acid composition of individual (olive, linseed and fish) oils and lipid mixture incorporated in oil-in-water emulsions were determined (in duplicate) by GC. Boron trifluoride/methanol was used for fatty acid methyl ester (FAME) preparation [22]. A Shimadzu gas chromatograph (Model GC-2014, Kyoto, Japan) fitted with a capillary column SPTM-2330 (60 m' 0.25 mm × 0.2 µm id) (Supelco, Inc, Bellefonte, USA) was used with a flame ionisation detector (FID). Injector and detector temperatures were 250 and 260 °C, respectively, and the oven temperature was 140 °C for 5 min, raised to 240 °C at a rate of 4 °C/min

Table 1. Formulation [g] of different oil-in-water emulsions.

Samples	O ^a	Water	SPI ^a	MS ^a	MTG ^a	SC ^a
O/SC	789.47	631.58				78.95
O/SPI	789.47	631.58	78.95			
O/SC + MTG + MS	789.47	608.00		23.58	5.37	78.95
O/SC + MTG	789.47	631.58			5.37	78.95
O/SPI + SC + MTG	789.47	631.58	78.95		5.37	14.21

^aO: Oil combination (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil); SC: sodium caseinate; SPI: soy protein isolate; MTG: microbial transglutaminase; MS: meat slurry.

and held for 20 min. Fatty acids were identified by comparison with a known standard FAME mixture (Supelco, Alltech Associated, Inc., Deerfield, IL, USA).

2.5 Emulsion stability

Thermal emulsion stability [23] of the different samples was determined (in quadruplicate) as follows. The sample was stuffed into tubes, which were hermetically sealed and heated in a water bath for 30 min at 70 °C; they were then opened and left to stand upside down (for 50 min) to release the separated fat and water onto a plate. Emulsion stability, as total fluid release, was expressed as % of initial sample weight. Creamy stability was determined (in quadruplicate) as visible phase separation in the plastic tubes containing the different samples after storage at 2 °C for 3 days. It was expressed as % of initial sample weight.

2.6 Instrumental colour measurement

The oil-in-water emulsions were removed from their plastic tubes and cut up. The colour of the cross-section was immediately measured by determining L^* , a^* and b^* using a CIELab scale, where L^* is the parameter that measures lightness, b^* the tendency towards yellow and a^* the tendency towards red. Measurements were performed on a Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Business Technologies, Inc., Tokyo, Japan). Determinations were performed in quintuplicate.

2.7 Penetration tests

Texture analysis was based on a penetration test [24] performed on the surface of oil-in-water emulsions (in plastic tubes) at room temperature (22 °C). The test was performed using a 6 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 5 Kg cell connected to the crosshead of TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY). The corresponding force-penetration curves (at 0.8 mm/s crosshead speed) were plotted and analysed. The rheological parameters of each sample derived from these curves were: distance at the point of gel rupture (D , mm) as an indicator of elasticity, slope of the force-deformation curve (S , dimensionless), penetration force (PF, N), the force exerted at the point of gel rupture, and gel strength (GS, J), which is defined as the area enclosed by the force-deformation curve. Determinations were carried out six times.

2.8 Dynamic rheological properties

Dynamic rheological experiments were conducted using a controlled stress rheometer (Bohlin CVR 50, Bohlin Instruments, Gloucestershire, UK) at 25 °C with parallel plates (20 mm diameter and 1 mm gap) and a solvent trap

to prevent evaporation. Samples were allowed to relax for 5 min before conducting rheological measurements such as equilibration time after loading the sample on the sensor system. Temperature control was carried out with a Peltier Plate system (−40 to +180 °C; Bohlin Instruments, Gloucestershire, UK). The linear viscoelastic region was determined for each sample through stress sweeps at 0.16 Hz. After that, a dynamic frequency sweep was conducted by applying a constant pre-determined stress within the linear region, over a frequency range between 0.01 and 10 Hz for each pre-emulsion. Viscoelastic properties (storage modulus, G' , loss modulus, G'') were determined as functions of angular frequency (ω , rad/s) using the Bohlin software. Results reported were averages of three measurements.

2.9 Microscopy

The microstructure was analysed by scanning electron microscopy (SEM). Samples were fixed with a mixture (1:1 v/v) of paraformaldehyde (4%) and glutaraldehyde (0.2%) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2, post-fixed with OsO_4 , washed, dehydrated in increasing concentrations of acetone, critical-point-dried, sputter-coated with gold/palladium in a metallizer (Balzer, SCD004) and scanned by SEM (Jeol, JSC, 6400, Akishima, Tokyo, Japan) at 20 kV. Sample O/SC was not susceptible to SEM examination as its consistency was too weak for fixing. A large number of micrographs were taken and the most representative ones selected.

2.10 Statistical analysis

Each oil-in-water emulsion was prepared in duplicate. The effects of the replicates and of the different oil-in-water formulations was analyzed using the Statgraphics Plus 5.1 (STSC Inc. Rockville, MD, USA) package with a one-way ANOVA. When the effect of formulation was significant ($P < 0.05$), least-squares differences were used to compare the mean values and the Tukey-HSD test was used to identify statistically significant differences. Analysis of results between replicates showed that in all cases the respective two mean values for a given property were not significantly different ($P < 0.05$). Therefore tables of properties display the corresponding mean and SD values calculated from both duplicates in each formulation.

3 Results and discussion

3.1 Proximate analysis and fatty acid composition

Proximate analyses generally differed little from one sample to another, and all were consistent with product formulation. The percentages of moisture and ash were around 42% and 0.2–0.3%, respectively, in all samples. Protein content ranged between 3.03 and 4.65%; it was lowest ($P < 0.05$)

in O/SC (3.03%) and O/SPI (3.36%) samples. Protein content was 3.95% in O/SC + MTG + MS and higher ($P < 0.05$) in O/SC + MTG (4.17%) and O/SPI + SC + MTG (4.65%), but all presented comparable values ($P > 0.05$). These differences were due to the stabilizing system used in the oil-in-water emulsions (Table 1) and hence to the presence of varying proportions of SC, SPI or muscle protein. While this did not affect fatty acid composition, it did affect the nature of the protein matrix and hence the characteristics of the emulsion, as noted further below.

Fat content was around 53% in all samples. The fatty acid profiles of individual oils (olive, linseed and fish) and healthier combination of them (used in oil-in-water emulsions) are reported in Table 2. Fatty acid composition differed for each type of oil. The fatty acid profile of the olive oil was characteristic of this kind of vegetable oil. It contained 15% SFA, 75% MUFA, with almost 72% oleic acid and 9% PUFA. Olive oil is the most monounsaturated of all vegetable oils and has a high biological value, attributed to a high ratio of vitamin E to polyunsaturated fatty acids. It has a lower ratio of saturated to monounsaturated fatty acids than any other vegetable oil and contains antioxidant substances in optimum concentrations [14]. Olive oil intake is associated with a lessened risk of heart disease and breast cancer, and it has positive effects on colon cancer. Also, it has beneficial effects on postprandial lipid metabolism and thrombosis and inhibits LDL oxidation [25]. The linseed oil contained low levels of SFA (Table 2) and high levels of PUFA, 53% of

which were n-3 PUFA in the form of linolenic acid and 15% n-6 PUFA in the form of linoleic acid. Fish oil is a very good source of n-3 PUFA (35%), most of them long chain (33%), with high levels of EPA (18.7%), and DHA (12%) acids (Table 2).

A unique combination of olive, linseed and fish oils was used to produce a lipid material with a fatty acid composition in line with health recommendations (Table 2). It contains a low proportion of SFA (less than 16%), of which only 11% (myristic and palmitic acids) have atherogenic properties [26]. Since these proportions are notably lower than those found in meat fat (around 25%) [26], the use of such oil-water emulsions in meat product reformulation can help to reduce the proportion of those fatty acids that increases the risk of cardiovascular disease (CVD).

The lipids in the oil-water emulsion contained high concentrations of MUFA (47.2%), the principal MUFA being oleic acid (43.3%) (Table 2). Typically, between 30 and 40% of the fatty acids in meat fat are MUFA, and so the inclusion of such fat in meat product formulation will promote MUFA content. The presence of MUFA in the diet reduces the level of low density plasma lipoprotein-cholesterol [27]. The MUFA content of the oil-water emulsions was approximately 24 g/100 g, accounting for around 45% of the total calories (approx. 490) in the emulsion. The PUFA content of the oil combination was 36%, consisting of 26% n-3 PUFA (5.29% long chain and 20.7% linolenic acid) and 10.2% n-6 PUFA (Table 2). This makes the PUFA content close to 20 g PUFA

Table 2. Fatty acid profile [as % of total fatty acids] and ratios of nutritional relevance of olive, linseed, and fish oils as well as the healthier oil combination used to prepare oil-in-water emulsions.

Fatty Acid	Olive Oil	Linseed oil	Fish oil	Oils combination
14:0	-	-	6.78 ± 0.05	1.18 ± 0.04
16:0	10.45 ± 0.71	5.09 ± 0.78	17.80 ± 0.10	9.85 ± 0.08
C18:0	3.99 ± 1.04	4.66 ± 0.02	3.55 ± 0.01	3.91 ± 0.02
C20:0	0.43 ± 0.01	0.19 ± 0.27	0.38 ± 0.01	0.41 ± 0.01
C21:0	-	-	2.79 ± 0.01	0.47 ± 0.01
∑ SFA	14.87 ± 1.76	9.94 ± 0.49	33.02 ± 0.12	15.81 ± 0.11
9c-16:1	0.68 ± 0.00	-	7.68 ± 0.07	1.64 ± 0.04
9c-18:1	71.74 ± 1.82	20.77 ± 0.09	9.25 ± 0.01	43.27 ± 0.00
11c-18:1	2.90 ± 0.04	0.97 ± 0.00	3.07 ± 0.02	2.24 ± 0.06
∑ MUFA	75.32 ± 1.78	21.74 ± 0.09	20 ± 0.04	47.15 ± 0.03
18:2 n-6	8.65 ± 0.26	15.23 ± 0.06	1.25 ± 0.04	10.15 ± 0.02
18:3 n-3	0.32 ± 0.02	53.08 ± 0.33	1.06 ± 0.02	20.77 ± 0.15
20:5 n-3	-	-	18.76 ± 0.03	3.04 ± 0.02
22:5 n-3	-	-	2.07 ± 0.01	0.32 ± 0.01
22:6 n-3	-	-	11.98 ± 0.06	1.93 ± 0.05
∑ PUFA	8.97 ± 0.24	68.31 ± 0.39	35.12 ± 0.10	36.21 ± 0.17
∑ trans Fat Acids	-	-	3.29 ± 0.03	0.38 ± 0.00
PUFA/SFA	0.60	6.87	1.09	2.29
∑ n-3	0.32 ± 0.02	53.08 ± 0.33	33.86 ± 0.06	26.06 ± 0.07
∑ n-6	8.65 ± 0.26	15.23 ± 0.06	3.56 ± 0.08	10.52 ± 0.02
n-6/n-3	26.75 ± 1.08	0.29 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.40 ± 0.00

Results are expressed as mean ± SD.

(36% of caloric value)/100 g of oil-in-water emulsion, of which 10 g was linolenic acid and 2.5 g/100 g EPA + DHA (4.5% of caloric value). There is abundant evidence to suggest that regular consumption of and/or dietary supplementation with long chain n-3 PUFA (docosapentaenoic acid, EPA and DHA) confers a number of health benefits [3, 28]. Intake of these fatty acids is usually too low in western diets, and increased consumption of them is therefore recommended [3]. Daily ranges vary depending on several factors and run from 180 to 1000 mg for EPA and DHA [28] or 3–5.5 g for total n-3 PUFAs [29].

Since the health implications of fat consumption are determined by the proportions between fatty acids, some recommendations are still made on the basis of specific fatty acid ratios. Accordingly, the recommended ratio of PUFA/SFA should be >0.4 , and <4 for the n-6/n-3 PUFA ratio [2, 26]. Excessive amounts of n-6 PUFA and very high n-6/n-3 PUFA ratios promote pathogenesis of many kinds, including CVD, cancer and inflammatory and autoimmune diseases, whereas increased levels of n-3 PUFAs (and low n-6/n-3 PUFA ratios) exert suppressive effects [3]. The oil combinations used in the oil-water emulsion formulation presented a PUFA/SFA ratio >2 , and a n-6/n-3 PUFA ratio of 0.4 (Table 2). PUFA/SFA and n-6/n-3 PUFA ratios in meat fat are naturally somewhat removed from the recommended values [26].

Hence, improved lipid content in meat-based foods can be induced by incorporation of this kind of oil-water emulsion in product formulation. Depending on the level of animal fat replacement, products can be made with smaller proportions of SFA and larger proportions of MUFA or PUFA (especially long chain n-3 PUFAs), better n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios, and lower cholesterol contents.

3.2 pH, emulsion stability and colour

The pH value was highest ($P < 0.05$) in the sample containing meat protein and MTG (O/SC + MTG + MS) and lowest in sample O/SPI (Table 3). All samples presented excellent fat and water binding properties, since there was no noticeable release of exudate during heating (thermal

emulsion stability) and after 3 days of chilling storage (creamy stability) in the different oil-in-water emulsions studied. These are useful technological characteristics for purposes of meat product formulation. Although oil-in-water emulsions stabilized with SC and SPI have been widely used in the reformulation of many cooked and fermented meat products [7], there have been no studies on their stability. Colour parameters were generally little affected by oil-in-water formulation (Table 3). No changes ($P < 0.05$) were observed in lightness values of the different samples, but the oil-in-water emulsions with the highest SC content showed lower redness values. Oil-in-water emulsion with SPI had the higher redness values (Table 3).

3.3 Penetration test

The penetration test results (Table 4) differentiate several types of behaviour in oil-in-water emulsions. In sample O/SC plunger penetration produced no breaking point and slope, PF and GS values were very low; in that case the system behaved like a viscous material but lacked a gel structure (gel-like behaviour). SC is commonly used as an emulsifier in the food industry because of its ability to rapidly confer a low interfacial tension and its strongly amphilic characteristics [30]. Sample O/SC is a type of oil-in-water emulsion commonly used to replace animal fat with a plant or marine fat in the formulation of cooked sausage [8, 13, 19] and fermented meat products [16].

In sample O/SPI there was again no breaking point, although PF and GS values were higher than in O/SC (Table 4); sample O/SPI would therefore appear to possess gel-like characteristics, if very weak ones. SPI are employed in a wide variety of food applications for their good technological properties, nutritional value and health benefits. Health claims by the FDA have resulted in increased consumer demand for products containing soy proteins [17]. SPI has been reported to form kinetically stable oil-in-water emulsions; it is known that these protein-covered oil droplets act as fillers, enhancing emulsion strength [31]. Such a system is stabilized by interactions occurring between the partially denatured proteins present in the dispersed phase [17]. Oil-in-water emulsions

Table 3. Variation of pH value and colour parameters (lightness- L^* , redness- a^* and yellowness b^*) of oil-in-water emulsions^a.

Samples	pH	L^*	a^*	b^*
O/SC	7.94 \pm 0.07b	89.36 \pm 0.64a	−4.66 \pm 0.15ab	21.85 \pm 0.24a
O/SPI	7.80 \pm 0.07a	87.87 \pm 0.11a	−3.97 \pm 0.06c	20.97 \pm 0.09a
O/SC + MTG + MS	8.65 \pm 0.09d	88.25 \pm 0.28a	−4.36 \pm 0.09b	21.51 \pm 0.39a
O/SC + MTG	8.18 \pm 0.04c	89.18 \pm 0.67a	−4.83 \pm 0.06a	22.12 \pm 0.66b
O/SPI + SC + MTG	7.98 \pm 0.07b	87.30 \pm 0.39a	−3.90 \pm 0.12c	20.81 \pm 0.31a

^a) O/SC: oil-in-water emulsion prepared with SC; O/SPI: oil-in-water emulsion prepared with SPI; O/SC + MTG + MS: oil-in-water emulsion prepared with SC, microbial transglutaminase (MTG) and meat slurry (MS); O/SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SC and MTG; O/SPI + SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SPI, SC and MTG. Means \pm SD. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 4. Penetration test parameters of oil-in-water emulsions^a.

Samples	Distance (mm)	Slope (N/mm)	Penetration force (N)	Gel strength (mJ)
O/SC	10.00 ± 0.000c	0.001 ± 0.000a	0.01 ± 0.001a	0.06 ± 0.004a
O/SPI	10.00 ± 0.000c	0.012 ± 0.001a	0.18 ± 0.003b	1.41 ± 0.027b
O/SC + MTG + MS	7.84 ± 0.264b	0.173 ± 0.004c	1.40 ± 0.032c	6.16 ± 0.374d
O/SC + MTG	8.45 ± 0.354b	0.144 ± 0.008b	1.26 ± 0.033c	5.85 ± 0.357d
O/SPI + SC + MTG	5.61 ± 0.390a	0.226 ± 0.011d	1.29 ± 0.027c	3.37 ± 0.365c

^aO/SC: oil-in-water emulsion prepared with SC; O/SPI: oil-in-water emulsion prepared with SPI; O/SC + MTG + MS: oil-in-water emulsion prepared with SC, microbial transglutaminase (MTG) and meat slurry (MS); O/SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SC and MTG; O/SPI + SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SPI, SC and MTG. Means ± SD. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

similar to sample O/SPI have been used, generally in the reformulation of fermented products [5, 16, 32].

The emulsions with MTG behaved quite differently (Table 4), with plunger penetration producing a breaking point similar to that of a gel structure. These emulsions presented breaking distances of less than 8.5 mm, the lowest values (maximum elasticity) occurring in sample O/SPI + SC + MTG. PF did not differ significantly among the samples containing MTG (O/SC + MTG, O/SC + MTG + MS, O/SPI + SC + MTG); the highest gel strength was observed in samples O/SC + MTG and O/SC + MTG + MS (Table 4). MTG activity and protein content help to explain differences in these emulsions properties. Gelling of an emulsion can be achieved by heating and enzymatic treatment. In cooked meat products it is based on a muscle protein thermal gelling process, which does not occur in uncooked (e.g. fermented) meat products. In both cases enzymatic cross-linking reactions offer new possibilities for improving the characteristics of oil-in-water emulsions for use as non-meat ingredients. MTG has been used to help stabilize emulsions made with SC and SPI [18]. In our experiment several emulsions were prepared with MTG (Table 1) to take advantage of the latter's ability to interact with some proteins. O/SC + MTG + MS, O/SC + MTG and O/SPI + SC + MTG samples presented clearly different penetration test parameters (Table 4) from those found in samples O/SC and O/SPI. Caseinate forms cross-links by means of MTG-forming polymers [33–35]; an interaction of this kind may have contributed to the fact that sample O/SC + MTG was more stiff and elastic than sample O/SC sample, without MTG (Table 4).

Various researchers have shown that MTG acts by cross-linking meat proteins at low temperature; it can therefore be used in meat processing to improve rheological properties while reducing, or even eliminating, the need for salts [36]. Caseinate has proven to be a good substrate for MTG [35], facilitating cross-linking between meat protein and caseinate molecules [33], which promotes the formation of a much more stable gel matrix at low temperatures. Meat proteins were therefore included in the emulsified-gelling systems (O/SC + MTG + MS) to modify the oil-in-water emulsion

properties. However, when compared with emulsion O/SC + MTG, the presence of meat protein produced no significant change in the penetration parameters (Table 4).

In the case of emulsion O/SPI + SC + MTG, the aim was to test the possibility of forming a combination SPI/SC gel/emulsion system, since both proteins are good substrates for MTG [18]. The combined use of caseinate and soy protein with MTG (O/SPI + SC + MTG) produced a gel/emulsion system with D and GS values lower ($P < 0.05$) than other samples formulated with MTG, but with similar ($P > 0.05$) PF values (Table 4).

3.4 Dynamic rheological properties

Figure 1 shows the storage and loss moduli (G' and G'' respectively) of oil-in-water emulsions as functions of the angular frequency of oscillatory deformation. Note that the stabilization system of the oil-in-water emulsion affected its rheological behaviour. Except in O/SC, sample behaviour was predominantly more elastic than viscous, with G' greater than G'' throughout the ω interval studied; however, there are some differences between their patterns, which suggests differences in viscoelastic behaviour. O/SPI, O/SC + MTG, O/SC + MTG + MS and O/SPI + SC + MTG have similar profiles in which G' presents a curve that is slightly dependent on frequency, while G'' is practically independent of frequency; also, there is a tendency for minimum values to occur at intermediate angular frequencies in the case of samples O/SPI and O/SC + MTG, which has been attributed to a weak gel [37, 38]. O/SPI + SC + MTG was the sample that presented the strongest gel behaviour, with the highest values of G' and G'' , which display practically no dependence on frequency (Fig. 1). It is well known that as the structural strength of such systems increases, the influence of the frequency diminishes, so that the gel structure is consolidated. However, the behaviour of sample O/SC was completely different (Fig. 1). At low frequencies G'' was higher than G' , indicating predominantly viscous behaviour up to intermediate frequencies where G' and G'' reversed places, with G' subsequently presenting higher values than G'' . It is elastic behaviour that predominates in this range, although both

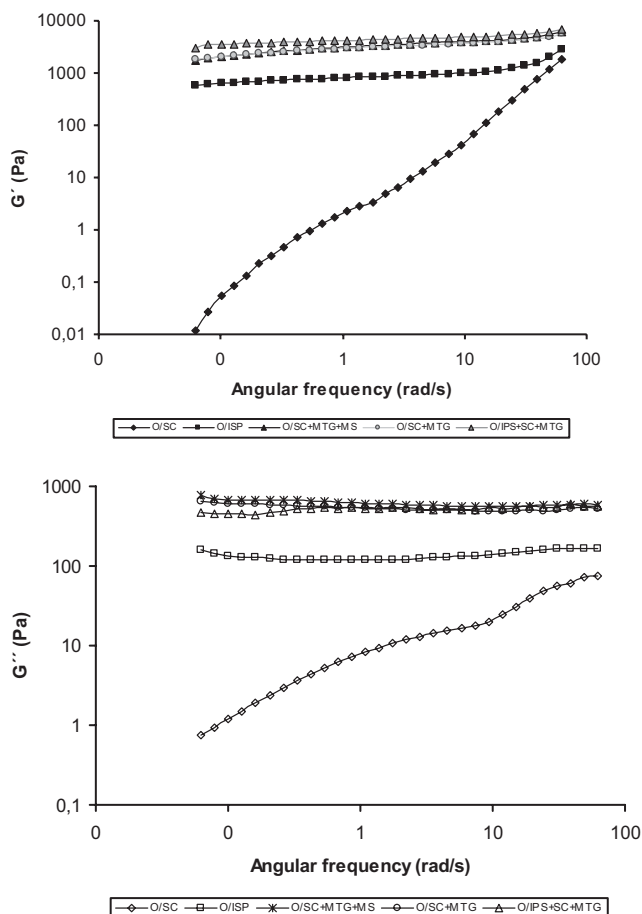


Figure 1. Storage modulus (G') and loss modulus (G'') of oil-in-water emulsions. O/SC: oil-in-water emulsion prepared with SC; O/SPI: oil-in-water emulsion prepared with SPI; O/SC + MTG + MS: oil-in-water emulsion prepared with SC, microbial transglutaminase (MTG) and meat slurry (MS); O/SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SC and MTG; O/SPI + SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SPI, SC and MTG.

moduli were strongly frequency-dependent. This means that samples behaved like a concentrate solution at low frequency and like a weak gel at higher frequencies.

The maximum rheological parameters measured (G' and G'') were recorded in sample O/SPI + MTG + SC, with values as high as 7000 Pa (for G'), although the differences from the other oil-in-water emulsions containing MTG (O/SC + MTG and O/SC + MTG + MS) were not great, the latter reaching 5600 and 5900 Pa, respectively. The lowest G' and G'' values were recorded in the samples stabilized only with sodium caseinate (O/SC) or soy protein isolate (O/SPI). There are various factors that can help explain these differences in behaviour. The emulsions formed with only SC or soy protein presented a concentrated solution-like and a weak gel-like structure respectively (Fig. 1) in which non-covalent weak reactions predominated. Since both emulsions had similar protein content, such differences may be attributable

to variation in the specific activity of SC and SPI. The surface activities and emulsifying properties of soy proteins and casein have been extensively studied [30, 39, 40]. Even though soy proteins typically possess weaker emulsifying properties when compared to other surface-active proteins, soy proteins exhibit strong emulsifying properties compared to other plant proteins [41]. This difference is mainly due to the compact tertiary structure and the quaternary structure of the protein components present in soy protein concentrates and isolates [40].

With regard to the dynamic rheological behaviour of samples with MTG, there are two additional factors to be considered: protein content and MTG activity. Samples contained more protein, favouring protein–protein interactions. On the other hand, new covalent bonds are produced by transglutaminase-catalysed cross-linking [33–36], which would account for the formation of structures that were stronger, more elastic structures (with higher elastic and viscous moduli) and less dependent on frequency (Fig. 1). The result of this is an increase in protein–protein interactions, producing a stronger structure, as further borne out by the penetration test results (Table 4).

3.5 Microscopy

The morphological characteristics of oil-in-water emulsions were investigated using SEM. In these emulsions the oil phase was aggregated and entrapped in a structured network, although there were some differences in the organization of the network structure depending on the protein system used to stabilize the oil-in-water emulsions.

Sample O/SC presented a homogeneous structure (Fig. 2a). This oil-in-water emulsion contained a large number of cavities (left by fat, air and moisture) of various sizes (generally larger than those present in the other samples—Fig. 2b–e), round or oval in shape and evenly distributed throughout the protein matrix. The high capillarity of this sample, associated with a denser but softer protein matrix, may help to explain why it behaved like a concentrate solution without exhibiting a gel-like structure as discussed previously.

The microstructure of oil-in-water emulsion stabilized with soy protein isolate (samples O/SPI and O/SPI + MTG + SC) contained clearly-observable soy protein structures (more evident in sample O/SPI) in the three-dimensional network formed (Fig. 2b and 2e). It has been reported that soy proteins aid in the formation of emulsions by reducing the interfacial tension between water and oil [42]. However, because of their globular aggregated structure, soy proteins do not unfold and adsorb at the interface, but rather form a thick interfacial layer which acts as physical barrier to coalescence [42, 43].

The MTG induced a cold-gelling process in oil-in-water emulsions, resulting in a more compact network structure with numerous small cavities (Fig. 2c–e). As reported previously, protein content can influence these morphological

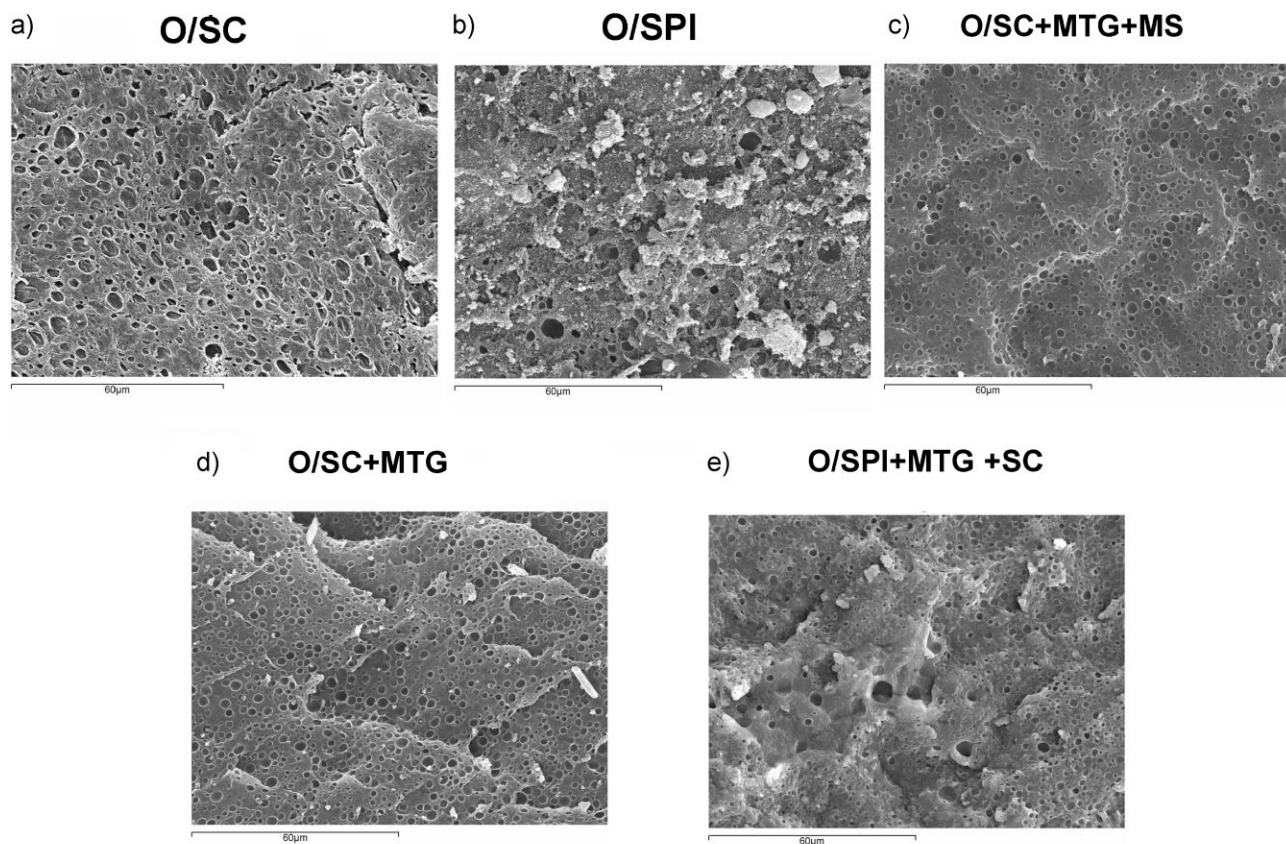


Figure 2. Scanning electron micrograph of oil-in-water emulsions: a) O/SC; b) O/SPI; c) O/SC + MTG + MS; d) O/SC + MTG; e) O/SPI + MTG + SC. O/SC: oil-in-water emulsion prepared with SC; O/SPI: oil-in-water emulsion prepared with SPI; O/SC + MTG + MS: oil-in-water emulsion prepared with SC, microbial transglutaminase (MTG) and meat slurry (MS); O/SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SC and MTG; O/SPI + SC + MTG: oil-in-water emulsion prepared with SPI, SC and MTG.

characteristics as well as MTG activity. Both factors favour protein–protein interaction, which may have contributed to the elasticity and stiffness of MTG-induced gels noted above (Table 4 and Fig. 1) [18]. This microstructure seems to be associated with good binding properties in gels. No clear morphological differences were observed between samples O/SC + MTG (Fig. 2d) and O/SC + MTG + MS (Fig. 2c) as was the case in other gel characteristics (Table 3 and Fig. 1), indicating that the characteristics of oil-in-water emulsion stabilized with SC and MTG were hardly affected by the addition of meat protein. Elasticity (related to distance at the point of gel rupture) and gel strength (Table 4) were clearly affected by disorganization and loss of regularity in the matrix (Fig. 2 e) caused by the presence of soy protein.

Oil-in-water emulsion technology has been shown to be feasible as a means of stabilizing the non-meat fats used for incorporation (animal fat replacement) in meat derivatives. Physicochemical properties of fat have been shown to be important in determining meat products characteristics [44]. However, its role in the meat protein matrix depends on various factors associated with the type of product

(hamburger, fresh, cooked or fermented sausage, etc.), degree of structural breakdown of raw materials during product manufacture, and ingredient characteristics, fat being very important in this respect. Hard fat (like pork backfat) and soft fat (animal fats containing an increased proportion of unsaturated fatty acids) are not equally suitable for use in specific meat products. The physicochemical properties required of oil-in-water emulsions as fat replacers may differ according to the kind of meat product concerned. Particle size distribution, rheological characteristics or interactions between the lipid phase and other ingredients—in a word, their role in the meat system—will necessarily differ depending on whether the non-meat ingredient is to be used in the formulation of fresh (e.g. patties, fresh sausages), cooked (e.g. frankfurters, bologna) or fermented (e.g. sausage) products. Oil-in-water emulsions as fat replacers offer the possibility of selecting formulations with mechanical and textural properties (as assayed in this experiment) specifically suited to the manufacture of particular meat products; this will offer new opportunities for the development of improved products.

4 Conclusion

Healthier lipid formulation based on processing strategies is one of the most important current approaches to the development of potential meat-based functional foods. Oil-in-water emulsion technology has been shown to be feasible as a means of stabilizing a mixture of vegetable (olive and linseed) and fish oils; these are combined in such a way as to produce an improved fatty acid profile with a low proportion of SFA, a high proportion of MUFA (oleic acid) and n-3 PUFA and a better balanced n-6/n-3 ratio. The physicochemical properties required of oil-in-water emulsions may differ according to the kind of meat product concerned. By using any of various protein systems based on SC, isolated soy protein, microbial transglutaminase and meat protein as stabilizers, we can produce healthier lipid emulsions with different properties, suitable for use as fat replacers in different types of new meat based-functional foods. The different physicochemical properties of such systems will determine their suitability for use as fat replacers in particular meat products. Work is currently in progress to assess the technological suitability of such healthier oil-in-water emulsions in different meat products.

The authors gratefully acknowledge funding from projects Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016), AGL2008-04892-CO3-01 and AGL2007-61038/ALI.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] WHO. Diet, Nutrition and the Prevention of chronic diseases, in *Technical report* WHO, Editor. 2003, Geneva (Switzerland).
- [2] Enser, M., Producing meat for healthy eating. In *Proceeding of the 46th International Congress of Meat Science and Technology* Vol I, Buenos Aires. pp 124–129. 2000.
- [3] Simopoulos, A. P., The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 2002, 56, 365–379.
- [4] Jiménez Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S., Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci.* 2001, 59, 5–13.
- [5] Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Astiasarán, I., New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 2004b, 15, 452–457.
- [6] Arhara, K., Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci.* 2006, 74, 219–229.
- [7] Jiménez-Colmenero, F., Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends Food Sci. Technol.* 2007, 18, 567–578.
- [8] Bishop, D. J., Olson, D. G., Knipe, C. L., Pre-emulsified corn oil, pork fat, or added moisture affect quality of reduced fat bologna quality. *J. Food Sci.* 1993, 58, 484–487.
- [9] Su, Y. K., Bowers, J. A., Zayas, J. F., Physical characteristics and microstructure of reduced-fat frankfurters as affected by salt and emulsified fat stabilized with nonmeat proteins. *J. Food Sci.* 2000, 65, 123–128.
- [10] Djordjevic, D., McClements, D. J., Decker, E. A., Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part B). *J. Food Sci.* 2004, 69, C356–362.
- [11] Hoogenkamp, H. W., Low-fat and low-cholesterol sausages. *Fleischerie* 1989a, 40, III–IV.
- [12] Hoogenkamp, H. W., Low-calories sausages, spread and mousses. *Fleischerie* 1989b, 40 IV–V and 40, III–IV.
- [13] Bloukas, J. G., Paneras, E. D., Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *J. Food Sci.* 1993, 58, 705–709.
- [14] Bloukas, J. G., Paneras, E. D., Fournitzis, G. C., Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Sci.* 1997, 45, 133–144.
- [15] Ansorena, D., Astiasarán, I., The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages. *Food Chem.* 2004, 87, 69–74.
- [16] Pelser, W. M., Linssen, J. P. H., Legger, A., Houben, J. H., Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. *Meat Sci.* 2007, 75, 1–11.
- [17] Roesch, R. R., Corredig, M., Characterization of oil-in-water emulsions prepared with commercial soy protein concentrate. *J. Food Sci.* 2002, 67, 2837–2842.
- [18] Lee, H. A., Choi, S. J., Moon, T. W., Characteristics of sodium caseinate-and soy protein isolate-stabilized emulsion-gels formed by microbial transglutaminase. *J. Food Sci.* 2006, 71, C352–C357.
- [19] Paneras, E. D., Bloukas, J. G., Filis, D. G., Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *J. Muscle Foods.* 1998, 9, 111–126.
- [20] AOAC. *Official methods of analysis of AOAC International*, 2000, Association of Official Analytical Chemistry, Maryland, USA.
- [21] Bligh, E. G., Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911–917.
- [22] Sánchez-Muniz, F. J., García-Linares, M. C., García Arias, M. T., Bastida, S., Viejo, J., Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.* 2003, 133, 2302–2308.
- [23] Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Solas, M. T., The effect of use of freeze-thawed pork on the properties of Bologna sausages with two fat levels. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1995, 30, 345–355.
- [24] Carballo, J., Fernández, P., Jiménez Colmenero, F., Texture of uncooked and cooked low- and high-fat meat batters as affected by high hydrostatic pressure. *J. Agri. Food Chem.* 1996, 44, 1624–1625.
- [25] Lurueña-Martínez, M. A., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Sci.* 2004, 68, 383–389.
- [26] Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R., Enser, M.,

- Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci.* 2004, 66, 21–32.
- [27] Mattson, F. H., Grundy, S. M., Comparison of effects of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.* 1985, 26, 194–202.
- [28] Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H., Moughan, P. J., Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *J. Food Sci.* 2006, 71, R66–R71.
- [29] Kolanowski, W., Swiderski, F., Berger, S., Possibilities of fish oil application for food products enrichment with ω -3 PUFA. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1999, 50, 39–49.
- [30] Dickinson, E., Golding, M., Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 1997, 191, 166–176.
- [31] Chen, J., Dickinson, E., Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: the effect of protein-surfactant interactions. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 91–97.
- [32] Muguerza, E., Ansorena, D., Astiasarán, I., Functional dry fermented sausages manufactured with high levels of n-3 fatty acids: nutritional benefits and evaluation of oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 2004a, 84, 1061–1068.
- [33] Kurth, L., Rogers, P. J., Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soy protein, casein and gluten. *J. Food Sci.* 1984, 49, 573–576 589.
- [34] Siu, N. C., Ma, C. Y., Mine, Y., Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a microbial transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2660–2665.
- [35] Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S. K., Soeda, T., Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat Sci.* 2003, 63, 191–197.
- [36] Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazani, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T., Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.* 1997, 62, 488–490 515.
- [37] Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B., Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Adv. Polym. Sci.* 1987, 83, 57–192.
- [38] Rao, M. A., Okechukwu, P. E., da Silva, P. M. S., Oliveira, J. C., Rheological behaviour of heated starch dispersions in excess water: role of starch granule. *Carbohydr. Polym.* 1997, 33, 273–283.
- [39] Wagner, J. R., Gueguen, J., Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 1. Foaming properties. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2173–2180.
- [40] Liu, M., Lee, D., Damodaran, S., Emulsifying properties of acidic sub-units of soy 11S globulin. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4970–4975.
- [41] Hettiarachcy, N. S., Kalaphaty, U., Functional properties of soy proteins, In: *Functional properties of proteins and lipids* (Eds.), S. F. J. R. Whitaker, A. L. Munguia, R. Y. Yada, G. Fuller, American Chemical Society, Washington, DC (USA) 1998, pp. 80–95.
- [42] Molina, E., Papadopoulou, A., Ledward, D. A., Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids.* 2001, 15, 263–269.
- [43] Dickinson, E., Stainsby, G., Emulsion stability, In: *Advances in food emulsions and foams* (Eds.), E. Dickinson, G. Stainsby, Elsevier Applied Science, London (UK) and New York (USA) 1988, pp. 1–44.
- [44] Barreto, G., Carballo, J., Fernandez-Martin, F., Jiménez Colmenero, F., Thermal gelation of meat batters as a function of type and level of fat and protein content. *Z Lebensm Unters Forsch* 1996, 202, 211–214.

IV.1.2. Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and Technological properties of low-fat frankfurters

European Journal of Lipid Science and Technology, 2010, 112, 859-870

Research Article

Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters

Gonzalo Delgado-Pando, Susana Cofrades, Claudia Ruiz-Capillas and Francisco Jiménez-Colmenero

Instituto del Frío (CSIC), Ciudad Universitaria, Madrid, Spain

Oil (healthier lipid combination of olive, linseed and fish oils)-in-water emulsions stabilized with different protein systems (prepared with sodium caseinate (SC), soy protein isolate (SPI) and microbial transglutaminase (MTG)) were used as pork backfat replacers in low-fat frankfurters. Composition (proximate analysis and fatty acid profile), sensory analysis and technological (processing and purge losses, texture and colour) properties of frankfurters were analysed as affected by the type of oil-in-water emulsion and by chilling storage (2°C, 41 days). Frankfurters produced with oil combinations had lower levels of saturated fatty acids (SFA, 19.3%), similar levels of MUFA (46.9%) and higher levels of PUFA (33.6%) than control frankfurters (all pork fat) (39.3, 49.5 and 10.6%, respectively). PUFA/SFA and *n*-6/*n*-3 PUFA ratios in control sample were 0.27 and 9.27; in reformulated frankfurters the PUFA/SFA ratio was higher (1.7) and the *n*-6/*n*-3 PUFA ratio was lower (0.47). In general, frankfurters had good fat and water binding properties. Colour parameters were affected by formulation and storage time. Compared to control sample, frankfurters made with oil-in-water emulsions had higher ($p < 0.05$) hardness, springiness and chewiness values. Emulsified oil stabilizing systems did not affect sensory characteristics of frankfurters, and all products were judged as acceptable.

Keywords: Chilling storage / Fatty acid profile / Frankfurter / Healthier oil combination / Oil-in-water emulsion

Received: March 10, 2010/ Revised: May 4, 2010/ Accepted: May 24, 2010

DOI: 10.1002/ejlt.201000076

1 Introduction

Comminuted cooked meat products (gel/emulsion systems) are a commercially important group of meat products, of which frankfurters are among the foremost. Frankfurters are popular, frequently-consumed meat products which are of considerable economic importance and enjoy wide consumer acceptance in certain sectors of the population. However, these products present some negative health concerns related to their fat content and fatty acid profiles [1–3]. Reformulation of frankfurters has been used to achieve better lipid compositions by reducing fat content and/or replacing

(to a greater or lesser extent) the animal fat normally present in the product with another fat (of plant and/or marine origin) whose characteristics are more in line with health recommendations: *i.e.* contain smaller proportions of saturated fatty acids (SFAs) and larger proportions of MUFA or PUFA fatty acids, especially long chain *n*-3 PUFA (LC *n*-3 PUFA), better *n*-6/*n*-3 PUFA and PUFA/SFA ratios, and if possible cholesterol-free [3].

A number of studies have been conducted to improve the lipid profile of finely comminuted cooked meat products such as frankfurters. In order to increase the MUFA content, frankfurters have been reformulated with the addition of high-oleic-acid sunflower oil [4, 5] or in most cases olive oil [1, 6–10] (among others). Animal fat has been partially replaced with various vegetable oils (cottonseed, corn, soya bean, peanut, *etc.*) to increase PUFA levels, improve fatty acid profiles (PUFA/SFA ratio) and reduce cholesterol contents of frankfurters [3]. Cottonseed and corn oils are very rich in PUFA and contain very high concentrations of linoleic acid (18:2 *n*-6) (>56% of total fatty acid); their addition to frankfurters does reduce PUFA/SFA ratios, but it also has the unwanted effect of raising the *n*-6/*n*-3 PUFA ratio [2, 8].

Correspondence: Francisco Jiménez-Colmenero, Instituto del Frío (CSIC), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain
E-mail: fjimenez@if.csic.es
Fax: +34-91-549-36-27

Abbreviations: AI, atherogenic index; CVD, cardiovascular disease; FAME, fatty acid methyl ester; MTG, microbial transglutaminase; SC, sodium caseinate; SFA, saturated fatty acid; SPI, soy protein isolate; TI, thrombogenic index; TPA, texture profile analysis

Soya bean oil contains high levels of both linoleic acid (56.1% of total fatty acid) and ALA (7.3%), and has been used in frankfurter formulation [2]. Vegetable and marine oils have been used to supply substantial amounts of *n*-3 PUFA in order to produce *n*-3 PUFA-enriched frankfurters [4, 11] and bologna-type sausage [12].

Incorporation of individual lipids (from only one source of plant or marine origin) does improve the fatty acid profile of meat products, but a better approximation to optimal lipid profile, meaning one more in line with health recommendations, can be achieved using healthier oil combinations as animal fat replacers. The rationale behind lipid modification to improve the health status of the population is that reducing SFA concentrations and increasing MUFA and PUFA contents, especially *n*-3 PUFA, will promote a reduction in the *n*-6/*n*-3 PUFA ratio [13–17]. While obviously such a healthier fatty acid composition can only be achieved by combining several types of lipid material (from both plant and marine sources), there have been few studies on reformulation of meat products, including frankfurters. Combinations of vegetable oils (olive, cottonseed and soya bean) have been used in frankfurter formulation following dietary guidelines for fatty acids [2]. A healthier lipid formulation (algal and olive oils) produced a low-fat frankfurter enriched with high levels of long *n*-3 PUFA and MUFA and a good balance of MUFA/SFA, PUFA/SFA and *n*-6/*n*-3 ratios [9, 18].

Oil-in-water emulsion technology has been shown to be feasible as a means of stabilizing the non-meat fats used for incorporation in meat derivatives [1, 3, 19, 20]. In a previous paper [21], our group used various protein systems (based on sodium caseinate (SC), soy protein isolate (SPI), meat protein and microbial transglutaminase (MTG)) to stabilize a healthier oil combination formed by vegetable (olive and linseed) and fish oils in suitable amounts and proportions to provide a fatty acid profile better adjusted to healthier intake goals [21]. These plant and marine oils were combined in such a way as to produce an improved fatty acid profile with a low proportion of SFA (15%) and a high proportion of MUFA (47%, 43% of oleic acid) and *n*-3 PUFA (36%, including a high proportion of long chain *n*-3 PUFA), with a PUFA/SFA ratio >2 and a *n*-6/*n*-3 PUFA ratio of 0.4, in line with recommendations for optimal intake of total and unsaturated fatty acids [13–15, 17]. These oil-in-water emulsions had different physicochemical characteristics depending on the system used to stabilize the emulsified oil [21]. Because they are added to frankfurters as fat ingredients (for animal fat replacement), their physicochemical characteristics affect their role in the meat system and hence the quality properties of the reformulated product [3]. Differences in physicochemical properties of such systems may determine their suitability for use as fat replacers in meat products such as finely comminuted cooked meat products [21]. Despite their possibilities, as far as the authors know there have been no studies on the use of such healthier lipid

combinations/stabilizing systems as fat ingredients in meat product formulation.

The aim of this experiment was to assess the suitability of healthier oil-in-water emulsions stabilized with various protein systems as pork backfat replacers in a comminuted gel/emulsion matrix, in this case frankfurters. The lipid phase of the oil-in-water emulsions (used as functional ingredients) was a combination of olive, linseed and fish oils, specially designed with fatty acids in suitable amounts and proportions for purposes of achieving healthier intake goals [21]. The oil-in-water emulsions were stabilized with various protein systems formulated using SC, SPI and MTG. Potential nutritional advantages (fatty acid profile) were assessed and sensory analyses conducted. Technological (processing and purge losses, texture, colour) properties of frankfurters were evaluated as affected by the type of oil-in-water emulsion and chilling storage (41 days at 2°C). Parallel to this study, our group has been assessing the influence of formulation and chilling storage on microstructure, microbiology, biogenic amine formation and lipid oxidation. This will be reported in another paper.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Fresh post-rigor pork meat (mixture of *Musculus biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. gracilis* and *M. adductor*) and pork backfat were obtained from a local meat market. The meat was trimmed of fat and connective tissue and the pork fat was passed through a grinder with a 0.4 mm plate. Lots of ~1 kg were vacuum packed, frozen and stored at –20°C until use, which took place within 2 weeks.

Ingredients used for the preparation of oil-in-water emulsions included olive oil (Carbonell Virgen Extra, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain), linseed oil (Natursoy S.L., Alimentos Ecológicos, Castellterçol, Spain) and fish oil (Omevital 18/12 TG Gold) from Cognis, Illertissen, Germany), according to supplier information containing 160 mg of EPA/g and 115 mg of DHA/g plus a combination of tocopherols as antioxidants. The materials used for oil-in-water emulsion stabilization were SC containing 86.4% protein (Julio Criado Gómez SA, Alcorcón, Spain), SPI containing 92.1% protein (Vicoprot, TRADES S.A., Barcelona, Spain) and MTG (ACTIVA WM, Ajinomoto Europe Sales, Hamburg, Germany). According to supplier information, the enzyme was in a mixture containing 1% transglutaminase and 99% maltodextrin, with a standard transglutaminase activity of ~100 units/g.

Others additives included sodium chloride (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain), sodium tripolyphosphate (Manuel Riesgo, S.A. Madrid, Spain), sodium nitrite (Fulka Chemie, Buchs, Germany), and flavouring (Gewürzmüller, Münichingen, Germany).

2.2 Preparation of oil-in-water emulsions

Three different types of oil-in-water emulsions were formulated (Table 1) and prepared according to the procedure described by Delgado-Pando *et al.* [21]. The lipid material, which was the same in all cases, consisted of a combination of olive, linseed and fish oils in respective proportions of 44.39, 37.87 and 17.74%. This oil combination was designed to produce a healthier lipid formulation with a small proportion of SFA, large proportions of MUFA and PUFA (including long chain *n*-3 PUFA) and balanced *n*-6/*n*-3 PUFA and PUFA/SFA ratios as reported by Delgado-Pando *et al.* [21]. The oil-in-water emulsions were stored 24 h at $2 \pm 2^\circ\text{C}$ before use in frankfurter preparation.

2.3 Design and preparation of healthy frankfurters

Four different frankfurters were formulated (Table 2): a control frankfurter (all pork fat) and three modified frankfurters reformulated by totally replacing pork backfat with one of the oil-in-water emulsions indicated in Table 1. These frankfurters had been designed to produce a healthier fatty acid profile than that of the pork fat: with less SFA, similar MUFA levels and higher *n*-3 PUFA levels (including long chain *n*-3 PUFA). The fat level in these frankfurters is lower than normally found in such meat products. Higher levels of pork fat reduction were not considered in this experiment as these would have reduced the amount of healthy oil combination that could be incorporated in place of the fat. One fundamental requirement of design and reformulation of these products with a view to potential health benefits is to assure that the lipid content and profile are such as to make a serious contribution to the recommended intake levels when consumed in normal quantities.

Meat and fat packages were thawed (~ 18 h at $2 \pm 2^\circ\text{C}$) prior to use. Preparation of the frankfurters was as described by Jiménez-Colmenero *et al.* [22]. Briefly, raw meat material was homogenized and ground for 1 min in a chilled cutter (2°C) (Stephan Universal Machine UM5, Stephan u. Söhne, Hameln, Germany). Half of the pork backfat or oil-in-water emulsion (depending on the formulation), NaCl, sodium tripolyphosphate and sodium nitrite (the last two previously

Table 1. Formulation (g) of different oil-in-water emulsions

Samples	Oil combination ^{a)}	Water	SPI ^{a)}	MTG ^{a)}	SC ^{a)}
O/SC	789.47	631.58	–	–	78.95
O/SPI	789.47	631.58	78.95	–	–
O/SPI + SC + MTG	789.47	631.58	78.95	5.37	14.21

^{a)} O, oil combination (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil); SC, sodium caseinate; SPI, soy protein isolate; MTG, microbial transglutaminase.

dissolved in the added water) were added to the ground meat and mixed again for 1 min. The rest of the additives, the pork backfat and the oil-in-water emulsion were added and the whole homogenized for 1 min. Finally the whole meat batter was homogenized under vacuum for 2 min. Mixing time was standardized at 5 min. The final batter temperature was below 14°C in all cases.

The meat batter was stuffed into 20 mm diameter Nojax cellulose casings (Viscase S.A., Bagnold Cedex, France) and hand-linked. Frankfurters were heat processed in an Eller smokehouse (model Unimatic 1000, Micro 40, Eller, Merano, Italy) until the core of the product reached 70°C . Heat processing conditions were established beforehand, and the internal temperature was monitored throughout heating by means of thermocouples inserted in each frankfurter (thermal centre) and connected to a temperature recorder (Yokogawa Hokuskin Electric YEM, Mod. 3087, Tokyo, Japan). Once heating was complete, the frankfurters were cooled (at room temperature), kept in a cold room (2°C for 14 h), packed (Cryovac[®] BB3050) and stored at 2°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) and analysed periodically over 41 days.

2.4 Proximate analysis and fatty acid composition

Moisture and ash contents of the frankfurters were determined [23] in triplicate. Fat content was evaluated (in triplicate) according to Bligh and Dyer [24]. Protein content was measured in quadruplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA).

Table 2. Formulation (g) of frankfurters made with pork backfat and the different oil-in-water emulsions described in Table 1

Sample ^{a)}	Meat	Pork backfat	Oil-in-water emulsion			Water
			O/SC	O/SPI	O/SPI + SC + MTG	
Control	2569.4	477.4	–	–	–	840.6
F/SC	2569.4	–	805.1	–	–	513.0
F/SPI	2569.4	–	–	805.1	–	513.0
F/SPI + SC + MTG	2569.4	–	–	–	805.1	513.0

^{a)} Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG, respectively) as pork backfat replacer. The following were also added to all samples: 2.0 g/100 g NaCl; 0.30 g/100 g sodium tripolyphosphate; 0.012 g/100 g sodium nitrite; 0.50 g/100 g flavouring.

Fatty acid composition of frankfurters was determined (in quintuplicate) by GC as reported by López-López *et al.* [18]. Briefly, boron trifluoride/methanol was used for fatty acid methyl ester (FAME) preparation. A Shimadzu gas chromatograph (Model GC-2014, Kyoto, Japan) fitted with a capillary column SPTM-2330 (60 m × 0.25 mm × 0.2 µm id) (Supelco, Bellefonte, USA) was used with a flame ionization detector. Injector and detector temperatures were 250 and 260°C, respectively, and the oven temperature was 140°C for 5 min, raised to 240°C at a rate of 4°C/min and held for 20 min. Fatty acids were identified by comparison with a known standard FAME mixture (Supelco, Alltech Associated, Deerfield, IL, USA).

Based on the FAME results, the atherogenic index (AI) and thrombogenic index (TI) were computed according to Ulbricht and Southgate [25].

$$AI = (C12 : 0 + 4C14 : 0 + C16 : 0) / [\Sigma MUFA + \Sigma PUFA(n-6) \text{ and } (n-3)];$$

$$TI = (C14 : 0 + C16 : 0 + C18 : 0) / [0.5 \Sigma MUFA + 0.5 \Sigma PUFA(n-6) + 3 \Sigma PUFA(n-3) + (n-3 \text{ PUFA}) / (n-6 \text{ PUFA})].$$

2.5 Processing loss and purge loss

Processing loss of frankfurters was calculated, in sextuplicate, as the weight loss (expressed as % of initial sample weight) occurring after heat processing and chilling overnight at 2°C.

Three vacuum packs *per* formulation were used to determine purge loss during chilling storage. After the frankfurters were removed from the package, the superficial exudate (tiny drops) was wiped off with paper towels and the frankfurters weighed again. The purge loss was calculated by weight difference and expressed as a percentage of the initial weight.

2.6 pH determination

The pH was determined on a Radiometer model PHM 93 pH-meter (Orion 3 Star, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) at room temperature on homogenates of frankfurters in water in a ratio of 1:10 w/v. Four determinations were performed for each sample.

2.7 Colour measurement

Colour, CIE-LAB tristimulus values, lightness, L^* ; redness, a^* and yellowness, b^* of frankfurter cross-sections were immediately evaluated on a CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Business Technologies, Tokyo, Japan). Six determinations were performed from each formulation.

2.8 Texture profile analysis (TPA)

TPA was performed in a TA-XT.plus Texture Analyzer (Texture Technologies, Scarsdale, NY, USA) as described by Bourne [26]. Six frankfurter cores (diam = 22 mm, height = 20 mm) were axially compressed to 40% of their original height. Force-time deformation curves were obtained with a 5 kN load cell, applied at a crosshead speed of 1 mm/s. Attributes were calculated as follows: hardness (Hd) = peak force (N) required for first compression; cohesiveness (Ch) = ratio of active work done under the second compression curve to that done under the first compression curve (dimensionless); springiness (Sp) = distance (mm) the sample recovers after the first compression; chewiness (Cw) = Hd × Ch × Sp (N mm). Measurement of samples was carried out at room temperature.

2.9 Sensory analysis

Frankfurters were assessed by a 15-member panel using a hedonic test. The panel was selected in preliminary sessions from staff who had received training (two sessions) with the products and terminology. Samples 2.5 cm long from each formulation were heated in a microwave for 15 s then immediately presented to panellists in random order. Judges were instructed to evaluate the juiciness, hardness, flavour and overall acceptability on a non-structured scale without fixed extremes. Each point was converted to a numerical value from: juiciness (0 = very dry, 9 = very juicy); hardness (0 = soft, 9 = hard); off-flavour (0 = no different from the typical flavour, to 9 = not typical flavour); and texture, flavour and overall acceptability (0 = dislike extremely to 9 = like extremely).

2.10 Statistical analysis

Each product was prepared in duplicate. The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples. Data were analysed using SPSS Statistics 17.0 (SPSS, Chicago, USA) for one-way and two-way ANOVA. Least squares differences were used for comparison of mean values among treatments and Tukey's HSD test to identify significant differences ($p < 0.05$) between formulations and storage times.

3 Results and discussion

3.1 Proximate analysis

Proximate analysis of frankfurters showed some significant differences between types of formulation (Table 3). The differences in moisture content were small (range 60.8–62.2%), with higher ($p < 0.05$) levels in control and F/SPI samples. Protein content ranged between 17.8 and 19.4% (Table 3). Since all samples were formulated with the same

Table 3. Proximate analysis (%) and energy content of frankfurters formulated with pork backfat and different oil-in-water emulsions^{a)}

Sample	Control	F/SC	F/SPI	F/SPI + SC + MTG
Moisture	61.77 ± 0.15 ^b	60.77 ± 0.15 ^a	62.21 ± 0.35 ^b	60.83 ± 0.44 ^a
Protein	17.89 ± 0.16 ^a	19.39 ± 0.28 ^c	17.80 ± 0.16 ^a	18.54 ± 0.40 ^b
Fat	12.30 ± 0.73 ^a	12.05 ± 0.15 ^a	11.39 ± 0.48 ^a	11.33 ± 0.06 ^a
Ash	3.32 ± 0.01 ^{ab}	3.58 ± 0.01 ^c	3.29 ± 0.03 ^a	3.37 ± 0.00 ^b
Energy content ^{b)}				
Total (kcal/100:g)	185.2	194.2	176.6	179.1
From fat (kcal/100 g) ^{c)}	111.9 (60.4)	114.7 (59.0)	103.6 (58.6)	103.1 (57.6)
From oils (kcal/100 g) ^{c)}	–	91.8 (47.3)	82.9 (46.9)	82.5 (46.0)

^{a)} Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG, respectively) as pork backfat replacer. Means ± SD. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

^{b)} Calculation based on 9.1 kcal/g for fat, and 4.1 kcal/g for protein.

^{c)} Calculated on the basis of formulation (~80% of fat content in modified samples is healthier oil combination). In brackets, percentage of energy content.

meat content (Table 2), the control sausage contained only muscle protein, mainly from meat, but also a small amount from pork backfat. In the modified frankfurters, on the other hand, because the pork backfat was totally replaced by oil-water emulsion, the sausages contained not only muscle protein (from meat only), but also non-meat proteins (Tables 1 and 2). The differences observed in ash content were small, even when significant, the highest ($p < 0.05$) being recorded in product F/SC (Table 3).

No differences ($p > 0.05$) were found in fat content of frankfurters; this was around 12%, which is lower than normally found in this type of meat products. While control frankfurter contained only pork fat, most of the fat in the reformulated sausages (total replacement of pork backfat by oil-water emulsion) were of plant and fish origin (Tables 1 and 2). In terms of ingredient composition and formulation, around 80% of the fat contained by modified frankfurters was supplied by the oil-in-water emulsion, which contained around 4.3, 3.6 and 1.6 g (*per* 100 g of the products) of olive, linseed and fish oils, respectively. A large variety of plant and marine oils (olive, cottonseed, sunflower, soya seed, high-oleic-acid sunflower, palm, fish, *etc.*) have been used individually to produce frankfurters; they have been added in variable proportions (2–20 g oil/100 g of product) and in different ways: directly during product manufacture (in liquid or solid form at the end of the process), oil-in-water emulsified (pre-emulsified generally with SC) or interesterified. When oil combinations have been incorporated in low-fat frankfurters, pre-emulsified with SC [2] or in liquid form [9, 18], the oil contents in the product have varied by between 4 and 6 g *per* 100 g of product. These proposals differ from the approach adopted in the present experiment in that the oil combination used is healthier and a higher proportion was added.

Energy content of the samples ranged from 176 to 194 kcal/100 g (Table 3), of which fat accounted for almost

60% (the remaining 40% or so from protein). Since in the F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG samples all pork backfat was replaced by oil-in-water emulsion, oil combinations accounted for almost 50% of total frankfurter energy content. The approximate energy supplied by olive, linseed and fish oils is 39, 32 and 14 kcal/100 g, respectively. Generally, differences in proximate analysis between samples are mainly due to differences in ingredients, and formulation and processing conditions.

3.2 Fatty acid profile

The fatty acid composition of frankfurters differed in control and modified samples (Table 4). The most abundant fatty acids in the control sample (all pork fat) were MUFA, followed by SFA and PUFA; MUFA and PUFA together accounted for 60% of total fatty acids. In control sample, oleic acid was the most abundant fatty acid, followed by palmitic and finally stearic and linoleic acids. These results are consistent with reports for fatty acid composition of frankfurters [11] and for pork fat [27].

Because of the healthy fatty acid composition of the oil-in-water emulsions, characterized by a low proportion of SFA and a high proportion of MUFA (mainly oleic acid) and *n*-3 PUFA [21], their addition to meat products as pork backfat replacers produced major changes in the fatty acid profiles of the reformulated frankfurters (Table 4). As compared with control sample, the reformulated products contained less ($p < 0.05$) SFA, among them palmitic and stearic acids. Although SFA are considered to be the chief risk factor because of their hypercholesterolaemic effect, not all of them act in the same way. While stearic acid is neutral, palmitic and myristic acids produce the greatest atherogenic effect [28]. The concentrations of these fatty acids (palmitic and myristic acids) decreased from 24.5 to 12.5% when pork backfat was replaced by the vegetable and marine oil combination.

Table 4. Fatty acid profile (as % of total fatty acids) and nutritional significant ratios of frankfurters^{a)}

Fatty acid	Frankfurters	
	Control	Modified
Myristic C 14:0	1.16 ± 0.05 ^a	1.11 ± 0.03 ^a
Palmitic C16:0	23.40 ± 0.34 ^b	11.42 ± 0.14 ^a
Stearic C18:0	13.78 ± 0.79 ^b	5.36 ± 0.06 ^a
Arachidic C20:0	0.25 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.01 ^b
Other SFAs	0.77 ± 0.45 ^a	1.09 ± 0.53 ^a
ΣSFA	39.36 ± 1.19 ^b	19.34 ± 0.56 ^a
Palmitoleic C16:1	1.84 ± 0.07 ^b	1.64 ± 0.03 ^a
Oleic C18:1 ⁿ 9	42.49 ± 0.90 ^a	42.52 ± 0.39 ^a
Vaccenic C18:1 ⁿ 7 ^c	3.57 ± 0.17 ^b	2.32 ± 0.02 ^a
Eicosenoic C20:1 ⁿ 9 ^c	1.17 ± 0.03 ^b	0.38 ± 0.01 ^a
Other MUFAs	0.46 ± 0.19	–
ΣMUFA	49.53 ± 0.96 ^b	46.86 ± 0.42 ^a
Linoleic C18:2 ⁿ 6	8.62 ± 0.28 ^a	10.78 ± 0.11 ^b
Linolenic C18:3 ⁿ 3	0.64 ± 0.05 ^a	17.70 ± 0.23 ^b
Eicosadienoic C20:2 ⁿ 6	0.53 ± 0.02	–
Arachidonic C20:4 ⁿ 6	0.35 ± 0.07	–
Eicosapentaenoic C20:5 ⁿ 3	–	2.55 ± 0.04
Docosapentaenoic C22:5 ⁿ 3	–	0.35 ± 0.01
Docosahexaenoic C22:6 ⁿ 3	–	1.71 ± 0.03
Other PUFAs	0.47 ± 0.05 ^a	0.52 ± 0.02 ^b
ΣPUFA	10.61 ± 0.48 ^a	33.61 ± 0.31 ^b
PUFA/SFA	0.27 ± 0.02 ^a	1.74 ± 0.07 ^b
Σ ⁿ -3	1.04 ± 0.10 ^a	22.83 ± 0.28 ^b
Σ ⁿ -6	9.56 ± 0.39 ^a	10.78 ± 0.11 ^b
ⁿ -6/ ⁿ -3	9.20 ± 0.58 ^b	0.47 ± 0.01 ^a
AI	0.47 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.00 ^a
TI	1.17 ± 0.06 ^b	0.18 ± 0.00 ^a

^{a)} Samples: Control, frankfurter formulated with all pork fat; Modified, frankfurters reformulated replacing pork backfat by an oil (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil)-in water emulsion. Since the three modified samples (F/SC, F/FSPI and F/SPI + SC + MTG) were formulated with the same lipid material, data reported are the mean values of these frankfurters. Means ± SD. Different letters in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$).

Although there were significant variations, there was little observable difference in MUFA contents of modified and control frankfurters, while oleic content was similar ($p > 0.05$, around 42%) in both types of frankfurter (Table 4). These results are consistent with the fact that the pork fat and the oil-in-water emulsions had very similar proportions of oleic acid (43%) and MUFA [21]. MUFA in the diet have a beneficial effect on the serum lipid profile [16, 29]. The incorporation of oil-in-water emulsions caused considerable changes in PUFA contents (Table 4). As compared with all-pork-fat frankfurters (control), modified samples contained more ($p < 0.05$) linoleic, linolenic, docosapentaenoic, EPA and DHA fatty acids, with total PUFA levels three times higher than in the control samples (Table 4). Total fatty acid

in fat [30], and the formulation (Table 2), indicate that total ⁿ-3 PUFA were around 2.5 g/100 g (of which ~2 g/100 g was ALA and 500 mg/100 g were long chain ⁿ-3 PUFA, EPA, docosapentaenoic acid and DHA) in modified frankfurters as opposed to around 0.11 g/100 g in all-pork-fat product. This means that although dietary recommendations vary depending on different factors (population, desired disease prevention, *etc.*), these products can make a very important contribution to dietary intake as compared to non-fortified frankfurters – considering that the dietary recommendation for total ⁿ-3 PUFA is estimated as between 1.4 and 3 g/day or even higher [14, 15, 29], while the estimated daily range for long chain ⁿ-3 PUFA is between 180 and 1000 mg [14, 29]. Recommended intakes for fatty acids are often expressed as a proportion of the total daily energy intake. In our reformulated products, the estimated energy contributions (as % of total energy content) of the different types of fatty acids were: SFA 6%, MUFA 26%, PUFA 18%, ⁿ-3 PUFA 12% (long chain ⁿ-3 PUFA 2%) and ⁿ-6 PUFA 6%, as compared to respective control sample values of 23, 28, 6, 0.5 and 5%. Meat products like these reformulated frankfurters (with low energy input from SFA and high energy input from PUFA) thus conform better to dietary recommendations for optimal intake of total, SFA and unsaturated fatty acid according to various national and international organizations [13, 29]. When consumed on a regular basis, such modified frankfurters can supply a significant proportion of recommended long chain ⁿ-3 PUFA intakes, higher than most of the reformulated cooked meat products reported in the literature, which generally contain less than 150 mg/100 g of ⁿ-3 PUFA [3]. ALA has been associated with a reduced risk of cardiovascular disease (CVD) [31]. Long chain ⁿ-3 PUFA are associated with a reduced risk of CVD, certain types of cancer, inflammatory diseases (rheumatoid, arthritis, asthma, lupus and ulcerative colitis), diabetes mellitus, multiple sclerosis and clinical depression [14].

The PUFA/SFA ratio is one of the main parameters currently used to assess the nutritional quality of the lipid fraction of foods. Nutritional guidelines recommend a PUFA/SFA ratio above 0.4 [27]. It has been reported that increasing the dietary PUFA/SFA ratio can lead to a reduction in plasma total cholesterol, and as a result there is a lot of research focusing on ways to improve this ratio in meat [31]. Whereas the PUFA/SFA ratio in control sample was around 0.3 (Table 4), which is consistent with reports by other authors in conventional meat products [11, 12], replacement of pork fat by a combination of plant and marine oils increased this ratio ($p < 0.05$) to 1.7 since SFA were reduced and PUFA increased (Table 4). Similar patterns have been reported in meat products incorporating different plant and fish oils [2, 8, 12, 32] or a high-fat ingredient (walnut) [33].

Scientific evidence suggests that a very high ⁿ-6/ⁿ-3 PUFA ratio promotes the pathogenesis of many diseases, including CVD, cancer, *etc.*, whereas increased ⁿ-3 PUFA content (a low ⁿ-6/ⁿ-3 PUFA ratio) exerts a suppressive effect

[17]. The dietary recommendation for prevention of CVD is to reduce this ratio to less than 4. Since not all *n*-3 PUFA and *n*-6 PUFA are equal with regard to their effect on health, the usefulness of this ratio has recently been questioned, in favour of more individualized consideration of linolenic acid and long chain *n*-3 PUFA [31]. Control samples presented an *n*-6/*n*-3 PUFA ratio of 9.2, similar to the ratios reported by other authors [12]. The addition of oil considerably reduced this ratio, almost down to 0.5 (Table 4). The reason for this was that while the *n*-3 PUFA content increased around 22-fold, the *n*-6 PUFA contents in control and modified samples were close to 10 (Table 4). These results are consistent with the findings of other authors [12, 34].

AI and TI values were lower ($p < 0.05$) in modified samples than in control product (Table 4). Similar AI and TI index values have been reported in all-pork-fat (normal and low fat) frankfurters [11]. As in this experiment, Ayo *et al.* [11] found that replacing animal fat with walnut produced a reduction of both indices.

According to the proposal to regulate nutrition claims concerning *n*-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat made on foods in Europe [29], reformulated frankfurters may be claimed to be *high omega-3 fatty acid* since they contain more than 30% of the recommended nutritional intake (2 g/day for an adult male) of *n*-3 fatty acids per 100 g of product (2.5 g/100 g). According to a recent Commission Regulation (European Parliament) no. 116/2010 (amending regulation 1924/2006) regarding the list of nutrition claims, a *high omega-3 fatty acid* claim may only be made where the product contains a minimum of 0.6 g ALA/100 g or a minimum of 80 mg of the sum of EPA and DHA per 100 g [35].

3.3 Processing loss, purge loss and pH

Processing loss of frankfurters ranged from 17.5 to 21% (Table 5), with highest processing loss values in the F/SC sample and no significant variations among the other samples. Ranges of processing loss for low-fat frankfurters (including those made with vegetable oils) between 10 and 20% have been reported [1, 4–6, 8, 10, 18, 36].

Purge accumulation in the packaged product during retail storage is undesirable for aesthetic and microbiological reasons. Purge loss levels over storage (ranging from 1.0 to 1.7%) were relatively low (Table 5), indicating good storage stability in terms of fat and water binding properties of the meat matrix. This stability was not dependent on the type of lipid used (pork backfat *versus* oil-in-water emulsion), nor did it vary with the protein system used to stabilize the plant and fish oils. Higher proportions of purge loss in low-fat frankfurters have been reported by other authors [1, 8, 18]. Generally, formulations and chilling storage affected purge loss very little; the differences observed were small, even when significant, and unlikely to be of practical importance. Pappa *et al.* [10] reported that replacing pork backfat with olive oil in low-fat frankfurters had no effect on purge loss. On the contrary, Bishop *et al.* [19] reported that purge loss was higher in bologna sausage containing emulsified oil than in bologna sausage containing pork backfat. Increasing purge loss with storage time has been reported in low-fat frankfurters [1, 6, 8], although other authors found no changes in purge loss during storage [37], as in this experiment.

Since pH values were not influenced ($p > 0.05$) by chilling storage, Table 5 shows only the mean values over the storage period. pH values (range 6.2–6.5) may be considered normal in products of this kind [1, 8]. The lowest ($p < 0.05$) pH values were recorded in the control frankfurter. The pH was higher ($p < 0.05$) in samples with added oil but was not affected ($p > 0.05$) by the particular emulsified oil stabilizing system used in the product reformulation (Table 5). This increase, which has been described by other authors [12, 38], is possibly related to the protein component [12] and to the lipid material of the oil-in-water emulsion. The pH values (5.96 ± 0.10) of the pork backfat used in the control formulation were lower than those of the oil-in-water emulsions (7.8 – 7.9) used in modified sausages [21].

3.4 Colour

Colour parameters were affected by formulation and storage time (Table 6). Generally, lightness, redness and yellowness values were higher ($p < 0.05$) in samples where pork backfat

Table 5. Processing loss (%), purge loss (%) and pH of frankfurters formulated with pork backfat and different oil-in-water emulsions

Samples ^{a)}	pH	Processing loss	Purge loss (storage days)			
			1	13	27	41
Control	6.25 ± 0.01^a	17.45 ± 0.65^a	1.59 ± 0.37^{bA}	1.43 ± 0.18^{aA}	1.51 ± 0.17^{aA}	1.75 ± 0.48^{bA}
F/SC	6.44 ± 0.03^b	20.97 ± 0.81^b	1.04 ± 0.20^{aA}	1.36 ± 0.17^{aA}	1.29 ± 0.10^{aA}	1.33 ± 0.10^{aA}
F/SPI	6.45 ± 0.07^b	17.84 ± 0.68^a	1.06 ± 0.22^{aA}	1.58 ± 0.25^{aB}	1.47 ± 0.19^{aB}	1.62 ± 0.14^{abB}
F/SPI + SC + MTG	6.46 ± 0.04^b	18.43 ± 0.94^a	1.20 ± 0.11^{abA}	1.30 ± 0.18^{aA}	1.41 ± 0.04^{aA}	1.37 ± 0.20^{abA}

^{a)} Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG, respectively) as pork backfat replacer. Means \pm SD. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 6. Colour parameters (L^* lightness, a^* redness and b^* yellowness) of frankfurters formulated with pork backfat and different oil-in-water emulsions

Sample ^{a)}		Storage time (days)			
		1	13	27	41
L^*	Control	71.24 ± 0.84 ^{aC}	64.28 ± 0.72 ^{aB}	62.15 ± 0.26 ^{aA}	62.94 ± 0.14 ^{aA}
	F/SC	72.34 ± 0.77 ^{bC}	66.06 ± 0.87 ^{bB}	63.13 ± 0.71 ^{bA}	63.12 ± 0.44 ^{abA}
	F/SPI	74.32 ± 0.52 ^{cC}	69.00 ± 0.50 ^{cB}	64.77 ± 0.55 ^{cA}	65.42 ± 0.58 ^{cA}
	F/SPI + SC + MTG	73.46 ± 0.34 ^{cC}	66.52 ± 0.89 ^{bB}	64.14 ± 0.58 ^{cA}	63.99 ± 0.48 ^{bA}
a^*	Control	8.42 ± 0.48 ^{aB}	8.32 ± 0.39 ^{aB}	7.86 ± 0.13 ^{abA}	7.69 ± 0.11 ^{aA}
	F/SC	9.81 ± 0.30 ^{cB}	9.71 ± 0.37 ^{cB}	8.27 ± 0.25 ^{bA}	8.42 ± 0.06 ^{bA}
	F/SPI	8.90 ± 0.27 ^{bB}	8.99 ± 0.13 ^{bB}	7.53 ± 0.20 ^{aA}	7.44 ± 0.12 ^{aA}
	F/SPI + SC + MTG	9.12 ± 0.16 ^{bC}	8.62 ± 0.53 ^{abB}	7.51 ± 0.11 ^{aA}	7.62 ± 0.15 ^{aA}
b^*	Control	10.11 ± 0.68 ^{aB}	8.07 ± 0.08 ^{aA}	8.38 ± 0.10 ^{aA}	8.05 ± 0.07 ^{aA}
	F/SC	11.26 ± 0.25 ^{bB}	10.05 ± 0.29 ^{bA}	9.73 ± 0.16 ^{bA}	9.70 ± 0.11 ^{bA}
	F/SPI	11.59 ± 0.15 ^{bcB}	10.56 ± 0.07 ^{cA}	10.25 ± 0.09 ^{cA}	10.26 ± 0.30 ^{cA}
	F/SPI + SC + MTG	11.96 ± 0.09 ^{cB}	10.31 ± 0.24 ^{bcA}	10.19 ± 0.12 ^{cA}	10.12 ± 0.13 ^{cA}

a) Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG respectively) as pork backfat replacer. Means ± SD. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences ($p < 0.05$).

had been replaced by oil-in-water emulsions. There were also some differences in colour parameters depending on the protein system used for oil-in-water emulsion stabilization. For instance, the increase in the parameter L^* (as compared with control sample) produced by addition of oil-in-water emulsion was smaller when the emulsified oil stabilizing system contained SC (Table 6). Similarly, the presence of SC seemed to influence the effect of the emulsion on frankfurter redness and yellowness, although the effect on lightness was less evident. It has been reported that differences in the colour of pork backfat and oil-in-water emulsions affect the colour parameter of frankfurters [39], possibly caused by the protein and lipid material in the emulsions. Other authors have reported that incorporation of non-meat proteins such as soy and caseinates as emulsified stabilizing fats in frankfurters had no effect on redness and yellowness, and that although soy protein did not affect lightness, SC reduced it [40]. Cáceres *et al.* [12] concluded that the incorporation of pre-emulsified fish oil with SC to bologna-type sausage caused an increase in lightness and a reduction of redness. It is also the case that oil has a significantly larger surface area than finely cut pork fat, and this makes the colour lighter [41]. López-López *et al.* [18] and Bishop *et al.* [19] reported that the replacement of pork backfat by olive oil increased lightness and reduced redness of sausages, although others authors [8, 42] have observed that oil substitution had no effect on colour. Also, Hong *et al.* [38] reported that redness of sausages increased when pork backfat was replaced with oil. These conflicting results are probably related to the type of sausage used, the product formulation and the characteristics of the oils assayed.

Colour parameters decreased ($p < 0.05$) over the storage period in all the different frankfurters (Table 6). The rate of the decrease in lightness was lower at the outset of storage, but both the rate and extent of the decrease were very similar in all samples. In the case of redness the pattern of behaviour over the storage period was similar, although the onset occurred later than in the case of lightness (Table 6). The decrease in b^* values over the storage period was greater in control samples than in modified frankfurters. Contrasting with our observations in the present experiment, there have been reports of increasing redness of reduced-fat frankfurters over time [43]. However, there have also been reports that storage time had no effect on the colour characteristics of low-frankfurters with added oils [1, 6, 42].

3.5 Texture

TPAs of frankfurters were affected ($p < 0.05$) by the presence of oil-in-water emulsions in the meat matrix (type of formulation) and by chilling storage (Table 7). TPA parameters indicated that compared with the control sample (all pork fat), the products with oil-in-water emulsions (F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG samples) presented higher ($p < 0.05$) hardness, springiness and chewiness values but the same ($p > 0.05$) cohesiveness. There are various factors that may help explain this; for instance, given that the same amount of meat was used in all samples (Table 2), in the reformulated products the oil combination was emulsified with non-meat protein and so more meat protein became available to contribute to gel formation [19]. Then again, it has been reported that oils achieve a better distribution than animal fat in meat emulsion matrixes, thus producing firmer

Table 7. TPA parameters of frankfurters formulated with pork backfat and different oil-in-water emulsions

Sample ^{a)}		Storage time (days)			
		1	13	27	41
Hardness (N)	Control	15.6 ± 0.6 ^{aA}	16.3 ± 0.4 ^{aAB}	17.8 ± 0.5 ^{aB}	15.1 ± 0.2 ^{aA}
	F/SC	24.6 ± 0.4 ^{bC}	23.5 ± 1.3 ^{bBC}	22.8 ± 0.7 ^{bAB}	21.9 ± 0.6 ^{cA}
	F/SPI	24.9 ± 1.9 ^{bB}	23.1 ± 0.7 ^{bA}	23.0 ± 0.7 ^{bA}	23.3 ± 0.7 ^{cA}
	F/SPI + SC + MTG	23.8 ± 0.6 ^{bC}	22.7 ± 1.4 ^{bBC}	21.4 ± 0.7 ^{bB}	19.6 ± 0.7 ^{bA}
Springiness (mm)	Control	6.3 ± 0.1 ^{aA}	6.5 ± 0.1 ^{aB}	6.8 ± 0.2 ^{aC}	6.7 ± 0.0 ^{aC}
	F/SC	6.6 ± 0.1 ^{bA}	6.8 ± 0.0 ^{bB}	6.8 ± 0.0 ^{aB}	6.9 ± 0.0 ^{bB}
	F/SPI	6.7 ± 0.0 ^{bA}	6.8 ± 0.2 ^{bAB}	6.9 ± 0.0 ^{aB}	6.9 ± 0.0 ^{bB}
	F/SPI + SC + MTG	6.8 ± 0.1 ^{bA}	6.9 ± 0.1 ^{bA}	6.9 ± 0.1 ^{aA}	6.8 ± 0.1 ^{abA}
Cohesiveness (dimensionless)	Control	0.680 ± 0.005 ^{aA}	0.691 ± 0.005 ^{aAB}	0.759 ± 0.073 ^{bC}	0.727 ± 0.002 ^{aBC}
	F/SC	0.680 ± 0.007 ^{aA}	0.696 ± 0.008 ^{abAB}	0.716 ± 0.003 ^{aAB}	0.722 ± 0.002 ^{aB}
	F/SPI	0.697 ± 0.003 ^{aA}	0.715 ± 0.005 ^{abAB}	0.762 ± 0.003 ^{abB}	0.733 ± 0.004 ^{aAB}
	F/SPI + SC + MTG	0.715 ± 0.004 ^{aA}	0.728 ± 0.004 ^{bA}	0.745 ± 0.009 ^{abA}	0.747 ± 0.003 ^{aA}
Chewiness (N mm)	Control	67.1 ± 3.4 ^{aA}	73.2 ± 2.0 ^{aA}	92.8 ± 11.1 ^{aB}	73.3 ± 0.4 ^{aA}
	F/SC	110.4 ± 2.6 ^{bA}	111.6 ± 5.6 ^{bA}	111.4 ± 2.8 ^{bA}	108.5 ± 2.6 ^{bA}
	F/SPI	117.2 ± 9.3 ^{bA}	112.6 ± 3.6 ^{bA}	116.7 ± 3.9 ^{bA}	118.6 ± 3.9 ^{cA}
	F/SPI + SC + MTG	115.0 ± 4.0 ^{bB}	113.3 ± 7.5 ^{bB}	109.5 ± 5.3 ^{bAB}	100.1 ± 4.5 ^{bA}

^{a)} Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG, respectively) as pork backfat replacer. Means ± SD. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences ($p < 0.05$).

sausages due to improved association with the protein [44]. However, conflicting results have been reported for the effect of vegetable oils on the texture of frankfurters. Substitution of pork fat by olive oil (stabilized with SC) in reduced-fat frankfurter (as compared to a normal-fat product) has been reported to produce a harder/firmer product [1, 2, 8] or to have no influence [1]. However, other authors have observed that olive oil addition combined with fat reduction (with similar protein content) caused a decrease in hardness and chewiness of frankfurters [7]. Marquez *et al.* [42] reported that there were no major changes in the firmness of low-fat frankfurters due to peanut oil treatment. As in the case of fat reduction strategies, the apparent discrepancies regarding the effect of substituting olive oil for animal fat may be related to varying extents to composition factors (moisture and protein content), to which a great deal of importance has been attached [45, 46].

The reformulated frankfurters generally differed little in terms of TPA textural parameters (Table 7). This was despite there being some variations in the protein contents of samples (Table 3) and some differences in the physicochemical characteristics of the oil-in-water emulsions used to replace animal fat [21]. These differences must be related to the protein system used to stabilize the emulsified oil, since the combination of oils was the same in all cases. The emulsion stabilized with SC behaved like a viscous material but lacked a gel-like behaviour; the emulsion with SPI appeared to possess gel-like characteristics, if very weak ones; and addition of MTG conferred a stronger gel-like structure

[21]. These characteristics influence the textural properties of frankfurters reformulated with olive oil-in-water emulsions in place of pork backfat in different ways (Jiménez-Colmenero *et al.*, submitted for publication). As was observed in the present experiment, when olive oil-in-water emulsions stabilized with SC or SPI (individually) were used to replace pork backfat in frankfurters, there were no observable effects on the hardness or chewiness of the product. However, conflicting results were observed when an oil-in-water emulsion was stabilized in the presence of MTG; the addition of MTG to the emulsion produced a significant increase in the hardness, cohesiveness and chewiness of the frankfurters (Jiménez-Colmenero *et al.*, submitted for publication). Although the influence of the MTG on the physicochemical properties of the emulsions used in this work was evident [21], there was no such effect on the textural properties of the frankfurters (Table 7). We can, therefore, state that in the given experimental conditions the physicochemical characteristics of the oil-in-water emulsions used to replace pork backfat had no clear effect on the textural properties of the frankfurters.

Chilling storage had a minor effect on some TPA parameters (Table 7). There was no clear trend associated with the type of sample, but as storage progressed there was some loss ($p < 0.05$) of hardness in reformulated products and increasing springiness and cohesiveness in control, F/SC and F/SPI samples. Kao and Lin [47] reported that shear force increased gradually in reduced-fat frankfurters with increasing storage time. And similarly, hardness has been reported to

Table 8. Sensory evaluation of frankfurters formulated with pork backfat and different oil-in-water emulsions

Sample ^{a)}	Juiciness	Hardness	Off flavour	Texture	Flavour	Overall acceptability
Control	5.2 ± 2.5 ^a	3.4 ± 1.7 ^a	3.7 ± 2.7 ^a	6.6 ± 1.9 ^b	6.5 ± 0.9 ^a	7.0 ± 1.2 ^b
F/SC	3.0 ± 2.0 ^a	6.5 ± 1.4 ^b	3.9 ± 2.4 ^a	3.1 ± 1.7 ^a	5.6 ± 1.6 ^a	5.5 ± 1.4 ^{ab}
F/SPI	4.0 ± 2.4 ^a	6.4 ± 1.3 ^b	5.0 ± 2.3 ^a	3.5 ± 1.9 ^a	5.2 ± 1.9 ^a	4.6 ± 2.1 ^a
F/SPI + SC + MTG	3.6 ± 1.7 ^a	6.2 ± 2.2 ^b	4.9 ± 2.4 ^a	3.5 ± 2.5 ^a	4.9 ± 1.8 ^a	4.6 ± 2.1 ^a

^{a)} Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG, respectively) as pork backfat replacer. Means ± SD. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

increase during chilling storage, a development attributed to changes in purge loss [36, 37]. However, texture was not affected by storage time in liver sausage and frankfurters where pork backfat and beef fat, respectively, were replaced by vegetable oils [38, 42].

3.6 Sensory analysis

Sensory evaluation indicated that pork backfat replacement by oil-in-water emulsions affected ($p < 0.05$) some sensory attributes of the frankfurters (Table 8). As compared with control (all pork fat) sample, hardness increased ($p < 0.05$) (and texture acceptability decreased significantly) in frankfurters formulated with oil-in-water emulsions. There were no significant differences in relation to the emulsion stabilizing system used. This is consistent with the fact that these samples were harder and chewier (Table 7), although the panellists did not report the textural differences between formulations (with oil-in-water emulsion) that were indicated by TPA.

There were no significant differences among any of the samples in terms of juiciness, although juiciness did tend to decrease as a result of total replacement of pork back fat by a healthy lipid combination. Pork backfat replacement by an oil-in-water emulsion had no effect on flavour appreciation parameters in the frankfurters. While all-pork-fat (control) frankfurters scored higher for flavour acceptability and lower for off-flavour, there were no significant differences between formulations (Table 8).

The panellists considered all products acceptable; the control sample scored highest ($p < 0.05$), but F/SC sausage scored almost as high, the lowest scores ($p < 0.05$) going to F/SPI and F/SPI + SC + MTG products. It has been reported that low-fat frankfurters produced by replacing pork backfat with olive oil had lower overall palatability or overall acceptability than high-fat frankfurters produced with pork backfat [1, 10].

4 Conclusions

Low-fat frankfurters (12%) can be manufactured using a healthier oil (from plant and marine sources) combination stabilized with different nonmeat protein systems, to give a

product with healthy lipid content (amount and fatty acid profile). This type of meat product with a low level of SFA and a high level of PUFA (including LC $n-3$ PUFA) approximates more to dietary recommendations for optimal intake of total, saturated and unsaturated fatty acids made by various national and international organizations [13, 29]. The technological properties and sensory characteristics demonstrate that it is possible to produce a healthier frankfurter. Additional studies on microstructure, microbiology, biogenic amine formation and lipid oxidation have been pursued at the same time to gain a clearer understanding of these products and will be reported in another paper.

This research was supported by projects AGL2007-61038/ALI and AGL2008-04892-CO3-01 under the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I + D + I) and the Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016), Ministerio de Ciencia y Tecnología.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Bloukas, J. G., Paneras, E. D., Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *J. Food Sci.* 1993, 58, 705–709.
- [2] Paneras, E. D., Bloukas, J. G., Filis, D. G., Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *J. Muscle Food* 1998, 9, 111–126.
- [3] Jiménez-Colmenero, F., Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends Food Sci. Technol.* 2007, 18, 567–578.
- [4] Park, J., Rhee, S. K., Keeton, J. T., Rhee, K. C., Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils. *J. Food Sci.* 1989, 54, 500–504.
- [5] Park, J., Rhee, K. S., Ziprin, Y. A., Low-fat frankfurters with elevated levels of water and oleic acid. *J. Food Sci.* 1990, 55, 871–872, 874.
- [6] Bloukas, J. G., Paneras, E. D., Fournitzis, G. C., Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Sci.* 1997, 45, 133–144.
- [7] Lurueña-Martínez, M. A., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement

- of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Sci.* 2004, 68, 383–389.
- [8] Paneras, E. D., Bloukas, J. G., Vegetable-oils replace pork backfat for low-fat frankfurters. *J. Food Sci.* 1994, 59, 725–728.
 - [9] Lopez-Lopez, I., Cofrades, S., Jimenez-Colmenero, F., Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Sci.* 2009, 83, 148–154.
 - [10] Pappa, I. C., Bloukas, J. G., Arvanitoyannis, I. S., Optimization of salt, olive oil and pectin level for low-fat frankfurters produced by replacing pork backfat with olive oil. *Meat Sci.* 2000, 56, 81–88.
 - [11] Ayo, J., Carballo, J., Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B. *et al.*, Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat Sci.* 2007, 77, 173–181.
 - [12] Caceres, E., Garcia, M. L., Selgas, M. D., Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n-3 – on microstructure and sensory properties of mortadella, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Sci.* 2008, 80, 183–193.
 - [13] WHO, Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, In: *Technical Report Series*, WHO, Geneva, Switzerland 2003, No. 916.
 - [14] Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H., Moughan, P. J., Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *J. Food Sci.* 2006, 71, R66–R71.
 - [15] Kolanowski, W., Swiderski, F., Berger, S., Possibilities of fish oil application for food products enrichment with ω -3 PUFA. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1999, 50, 39–49.
 - [16] Mattson, F. H., Grundy, S. M., Comparison of effects of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J. Lipid Res.* 1985, 26, 194–202.
 - [17] Simopoulos, A. P., The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 2002, 56, 365–379.
 - [18] López-López, I., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jimenez-Colmenero, F., Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Sci.* 2009, 83, 255–262.
 - [19] Bishop, D. J., Olson, D. G., Knipe, C. L., Pre-emulsified corn oil, pork fat, or added moisture affect quality of reduced fat bologna quality. *J. Food Sci.* 1993, 58, 484–487.
 - [20] Djordjevic, D., McClements, D. J., Decker, E. A., Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part B). *J. Food Sci.* 2004, 69, C356–362.
 - [21] Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., Jiménez-Colmenero, F., Characteristics of oil (healthier lipid combination)-in-water emulsions prepared with various protein systems. An approach for the development of functional meat products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, DOI: 10.1002/ejlt.200900234.
 - [22] Jiménez-Colmenero, F., Barreto, G., Mota, N., Carballo, J., Influence of protein and fat content and cooking temperature on texture and sensory evaluation of bologna sausage. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995, 28, 481–487.
 - [23] AOAC, Official methods of analysis of AOAC International, Association of Official Analytical Chemistry, Maryland, USA 2000.
 - [24] Bligh, E. G., Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911–917.
 - [25] Ulbricht, T. L. V., Southgate, D. A. T., Coronary heart-disease – 7 dietary factors. *Lancet* 1991, 338, 985–992.
 - [26] Bourne, M. C., Texture profile analysis. *Food Technol.* 1978, 32, 62–65.
 - [27] Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V. *et al.*, Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Sci.* 2004, 66, 21–32.
 - [28] Hu, F. B., Manson, J. E., Willett, W. C., Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001, 20, 5–19.
 - [29] EFSA, Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat. *EFSA J.* 2005, 253, 1–29.
 - [30] MAFF: Fatty acids. Supplement to McCance & Widdowson's. The Composition of Foods. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London 1998.
 - [31] McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W. *et al.*, Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Sci.* 2010, 84, 1–13.
 - [32] Vural, H., Javidipour, I., Ozbas, O. O., Effects of interesterified vegetable oils and sugarbeet fiber on the quality of frankfurters. *Meat Sci.* 2004, 67, 65–72.
 - [33] Serrano, A., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Olmedilla-Alonso, B. *et al.*, Nutritional profile of restructured beef steak with added walnuts. *Meat Sci.* 2005, 70, 647–654.
 - [34] Valencia, I., Ansorena, D., Astiasaran, I., Development of dry fermented sausages rich in docosahexaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp.: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. *Food Chem.* 2007, 104, 1087–1096.
 - [35] Commission Regulation (EU) No 116/2010 of 9 February 2010 amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims. *Of. J. Eur. Union.* 2010, L37, 18.
 - [36] Candogan, K., Kolsarici, N., The effects of carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. *Meat Sci.* 2003, 64, 199–206.
 - [37] Andres, S. C., Garcia, M. E., Zaritzky, N. E., Califano, A., Storage stability of low-fat chicken sausages. *J. Food Eng.* 2006, 72, 311–319.
 - [38] Hong, G., Lee, S., Min, S., Effects of replacement pork backfat with soybean oil on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Sci. Biotechnol.* 2004, 13, 51–56.
 - [39] Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Pintado, T., Solas, M. T., Ruiz-Capillas, C., Influence of emulsified olive oil stabilizing system used for pork backfat replacement in frankfurters. *Food Res. Inter.*, DOI: 10.1016/j.foodres.2010.06.010.
 - [40] Su, Y. K., Bowers, J. A., Zayas, J. F., Physical characteristics and microstructure of reduced-fat frankfurters as affected by

- salt and emulsified fat stabilized with nonmeat proteins. *J. Food Sci.* 2000, 65, 123–128.
- [41] Feiner, G., *Meat Products Handbook. Practical Science and Technology*, Woodhead Publishing, Cambridge, England 2006.
- [42] Marquez, E. J., Ahmed, E. M., West, R. L., Johnson, D. D., Emulsion stability and sensory quality of beef frankfurters produced at different fat and peanut oil levels. *J. Food Sci.* 1989, 54, 867–870, 873.
- [43] Calhoun, C. M., Eilert, S. J., Mandigo, R. W., Connective tissue/acidic phosphate preblend effects on reduced fat frankfurters. *J. Food Sci.* 1996, 61, 459–464.
- [44] Hammer, G., Verarbeitung pflanzlicher öle zu brüwurst. *Fleischwirtschaft* 1991, 71, 1248–1254.
- [45] Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M. T., Jiménez-Colmenero, F., Morphology and texture of bologna sausage containing different levels of fat, starch and egg white. *J. Food Sci.* 1996, 61, 652–655.
- [46] Claus, J. R., Hunt, M. C., Kastner, C. L., Effects of substituting added water for fat on the textural, sensory, and processing characteristics of bologna. *J. Muscle Foods* 1989, 1, 1–21.
- [47] Kao, W. T., Lin, K. W., Quality of reduced-fat frankfurter modified by konjac-starch mixed gels. *J. Food Sci.* 2006, 71, S326–S332.

IV.1.3. Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation

Meat Science, 2011, 89, 65-71



Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation

Gonzalo Delgado-Pando^a, Susana Cofrades^a, Claudia Ruiz-Capillas^a, Maria Teresa Solas^b, Mehdi Triki^a, Francisco Jiménez-Colmenero^{a,*}

^a Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición-ICTAN (formerly Instituto del Frío) (CSIC), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2010

Received in revised form 25 March 2011

Accepted 28 March 2011

Keywords:

Frankfurter

Healthier oil combination

Oil-in-water emulsion

Meat-based functional foods

Chilling storage

Physicochemical properties

ABSTRACT

Oil (healthier lipid combination of olive, linseed and fish oils)-in-water emulsions stabilized with different protein systems (prepared with sodium caseinate (SC), soy protein isolate (SPI), and microbial transglutaminase (MTG)) were used as pork backfat replacers in low-fat frankfurters. Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation of frankfurters were analyzed and found to be affected by the type of oil-in-water emulsion and by chilling storage (2 °C, 41 days). Although the lipid oxidation levels attained were low, replacement of animal fat by healthier oil combinations in frankfurter formulation did promote a slight increase in lipid oxidation. Residual nitrite was affected ($P < 0.05$) by formulation and storage. Only 51–61% of the added nitrite was detectable in the product after processing and 17–46% at the end of storage. The microbial population was low in all formulations during chilling storage. Spermine was the most abundant amine (19–20 mg/kg), but similar in level to all samples.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Healthier lipid formulation based on processing strategies is one of the most important current approaches to the development of potential meat based functional foods. Reformulation of frankfurters has been used to achieve better lipid compositions by reducing fat content and/or replacing the animal fat normally present in the product with another fat (of plant and/or marine origin) whose characteristics are more in line with health recommendations: i.e. contain smaller proportions of saturated fatty acids (SFA) and larger proportions of monounsaturated (MUFA) or polyunsaturated (PUFA) fatty acids, especially long chain n-3 PUFA, better n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios, and if possible cholesterol-free (Jiménez-Colmenero, 2007). A number of studies have been conducted to improve the lipid profile of finely comminuted cooked meat products like frankfurters (Bloukas & Paneras, 1993; Jiménez-Colmenero, 2007; Paneras & Bloukas, 1994; Park, Rhee, Keeton, & Rhee, 1989). Incorporation of individual lipids (from only one source of plant or marine origin) does improve the fatty acid profile of meat products, but a better approximation to optimal lipid profiles, meaning one more in line with health recommendations, can be achieved using

healthier oil combinations as animal fat replacers (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Solas, & Jiménez-Colmenero, 2010; García-Iníguez de Ciriano et al., 2010; López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009; Paneras, Bloukas, & Filis, 1998). Among the various technological options for replacement of animal fat, oil-in-water emulsion technology (pre-emulsion) has been shown to be viable as a means of stabilizing the non-meat fats used for incorporation in meat derivatives (Bishop, Olson, & Knipe, 1993; Bloukas & Paneras, 1993; Djordjevic, McClements, & Decker, 2004; Jiménez-Colmenero, 2007). A number of procedures have been reported for producing an oil (plant or marine) pre-emulsion for incorporation in meat derivatives (Jiménez-Colmenero, 2007). Because they are added to frankfurters as fat ingredients, their physicochemical characteristics can affect their role in the meat system and hence the quality properties of the reformulated product (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Solas, et al., 2010).

In a previous paper our group (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010) assessed the suitability of a healthier oil combination stabilized (oil-in-water emulsion) with various protein systems as pork backfat replacers in low-fat frankfurters. The healthier oil combination was formed by vegetable (olive and linseed) and fish oils in suitable amounts and proportions to produce a fatty acid profile more in line with healthier intake goals. The authors reported the nutritional advantages (fatty acid profile), sensory analyses and technological properties of frankfurters as affected by the

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail address: fjimenez@if.csic.es (F. Jiménez-Colmenero).

type of oil-in-water emulsion and chilling storage. Total n-3 PUFA of the reformulated products were around 2.5 g/100 g, of which approximately 2 g/100 g was α -linolenic acid and 500 mg/100 g were long chain n-3 PUFA, docosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), a composition more in line with dietary recommendations for optimal intake of total, saturated and unsaturated fatty acids. Technological properties and sensory characteristics show that it is possible to produce such healthier frankfurters. However, other aspects such as safety, shelf-life and morphological characteristics need to be considered in order to gain a clearer understanding of these products and a more accurate assessment of the suitability of this strategy for a healthier reformulation of frankfurters. To that end, in parallel to Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, and Jimenez-Colmenero (2010), the additional studies described in this paper were carried out to assess the influence of the type of oil-in-water emulsion (as a pork backfat replacer) and chilling storage (41 days at 2 °C) on microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation in frankfurters. As in the experiment reported in Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, and Jimenez-Colmenero (2010), oil (healthier lipid combination of olive, linseed and fish oils)-in-water emulsions stabilized with different protein systems (prepared with sodium caseinate (SC), soy protein isolate (SPI), and microbial transglutaminase (MTG)) were used as pork backfat replacers in low-fat frankfurters.

2. Materials and methods

2.1. Materials, healthy frankfurters preparation and chilled storage

The ingredients used for the manufacture of oil-in-water emulsions and frankfurters, the procedures for preparation of oil-in-water emulsions (Table 1), experimental design, preparation of healthy frankfurters (Table 2) and the chilling storage conditions were as reported by Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, and Jimenez-Colmenero (2010). Four different formulations were studied (Table 2): a control frankfurter (all pork fat) and three modified frankfurters reformulated by totally replacing pork backfat with one of the oil-in-water emulsions (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010). The samples were vacuum-packed, stored at 2 °C (± 1 °C) and analyzed periodically (days 1, 13, 27 and 41).

2.2. Microstructure

Microstructure was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) as reported by Jiménez-Colmenero, Carballo, and Solas (1995). The frankfurters were fixed with a mixture (1:1 v/v) of paraformaldehyde (4 g/100 g) and glutaraldehyde (0.2 g/100 g) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2, post-fixed with OsO₄, washed, dehydrated in increasing concentrations of acetone, critical-point-dried, sputter-coated with gold/palladium in a metallizer (Blazer, SCD004) and scanned by SEM (Jeol, JSC 6400, Akishima, Tokyo, Japan) at 20 kV. A large number of micrographs were taken in order to select the most representative ones.

Table 1
Formulation (g) of different oil-in-water emulsions.

Samples	Oil combination	Water	SPI	MTG	SC
O/SC	789.47	631.58	–	–	78.95
O/SPI	789.47	631.58	78.95	–	–
O/SPI + SC + MTG	789.47	631.58	78.95	5.37	14.21

O: oil combination (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil); SC: sodium caseinate; SPI: soy protein isolate; MTG: microbial transglutaminase.

Table 2
Formulation (g) of frankfurters made with pork backfat and the different oil-in-water emulsions.

Sample	Meat	Backfat	Oil-in-water emulsion			Water
			O/SC	O/SPI	O/SPI + SC + MTG	
Control	2569.4	477.4	–	–	–	840.6
F/SC	2569.4	–	805.1	–	–	513.0
F/SPI	2569.4	–	–	805.1	–	513.0
F/SPI + SC + MTG	2569.4	–	–	–	805.1	513.0

Control: frankfurter formulated with pork backfat. F/SC, F/SPI and F/SPI + SC + MTG: frankfurters formulated with oil-in-water emulsion (O/SC, O/SPI and O/SPI + SC + MTG respectively) as pork backfat replacer. The following were also added to all samples: 2.0 g/100 g NaCl; 0.30 g/100 g sodium tripolyphosphate; 0.012 g/100 g sodium nitrite; 0.50 g/100 g flavoring.

2.3. Lipid oxidation

Oxidative stability was evaluated by changes in thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). The procedure for measurement of TBARS was based on methods used by Serrano, Cofrades, and Jiménez-Colmenero (2006). Briefly, the procedure was as follows: 5 g of each sample was homogenized in 35 ml of 7.5% trichloroacetic acid for 1 min at high speed in an Ultraturrax blender (Ika-Werke, GmbH & Co, Staufen, Germany). The blender sample was centrifuged (3000 g, 2 min) and 5 ml of the supernatant was mixed with 5 ml of 20 mM thiobarbituric acid; finally the solution was mixed and kept in the dark for 20 h at 20 \pm 1.5 °C. The pink color that formed was measured spectrophotometrically (Lambda 15 UV/VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer, USA) at 532 nm. A calibration curve was plotted with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to obtain the malonaldehyde (MDA) concentration and results were expressed as mg MDA/kg of sample. TBARS determinations for each sample were performed in duplicate.

2.4. Determination of residual nitrite

Residual nitrite contents were determined using the flow injection analysis according to Ruiz-Capillas, Aller-Guiote, and Jiménez-Colmenero (2007a). Results, expressed as mg/1000 g of sample, were averages of 3 determinations per sample.

2.5. Microbiological analysis

Samples were prepared in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each sample, 10 g (in replicate) was taken and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of peptone water (0.1%) and 0.85% NaCl (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA) (Merck, Germany) for total viable count (TVC) (30 °C for 72 h); De Man, Rogosa, Sharp Agar (MRS) (Merck, Germany) for lactic acid bacteria (LAB) (30 °C for 3–5 days); and Violet Red Bile Glucose Agar (Merck, Germany) for *Enterobacteriaceae* (37 °C for 24 h). The results were expressed as logarithms of colony forming units per gram (Log cfu/g).

2.6. Analysis of biogenic amines (BA) by ion-exchange chromatography

Tyramine, phenylethylamine, histamine, putrescine, cadaverine, agmatine, spermidine and spermine were determined in an extract prepared by blending 25 g of each sample with 50 ml of 7.5% trichloroacetic acid in an Ultraturrax homogenizer (IKA-Werke, Janke, & Kunkel, Staufen, Germany) (20,000 rpm, 3 min) and centrifuged at 5000 g for 15 min at 4 °C in a desktop centrifuge (Sorvall RTB6000B, DuPont, USA). The supernatants were filtered through a 0.45 μ m Millipore filter, and 10 μ l of this filtrate was injected into an HPLC

model 1022 (Perkin Elmer) with a Pickering PCX 3100 post-column system (Pickering Laboratories, Mountain View, Ca, USA) following the methodology of Ruiz-Capillas and Moral (2001). The results are averages of at least 2 determinations from two extractions per sample.

2.7. Statistical analysis

The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010). Data were analyzed using SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) for one-way and two-way ANOVA. Least squares differences were used for comparison of mean values among treatments and Tukey's HSD test to identify significant differences ($P < 0.05$) between formulations and storage times.

3. Results and discussion

It has been suggested that foods that are strategically or naturally enriched in healthier fatty acids can be used to achieve desired health benefits without the intake of supplements or changes in dietary habit. In a previous paper Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, and Jimenez-Colmenero (2010) reported the proximate composition and fatty acid profile, sensory analyses and processing and purge losses, pH, texture profile analysis and color of frankfurters as affected by the type of oil-in-water emulsion (used as functional ingredients) and chilling storage (41 days at 2 °C). The following sections deal with different aspects relating to morphological, safety and shelf-life characteristics that are essential to gain a clearer understanding of these products.

3.1. Microstructure

The morphology of the control sausages (Fig. 1a) was characteristic of cooked gel/emulsion systems (Carballo, Fernandez, Barreto, Solas, & Jiménez-Colmenero, 1996; Carballo, Fernández, Barreto, Solas, & Jiménez-Colmenero, 1996; Katsaras & Peetz, 1989) showing the formation of numerous cavities, producing structures with a spongy (honeycomb-like) appearance. The formation of these cavities may have been due to expansion of a number of constituents, mainly fat, water or air (Cavestany, Jiménez-Colmenero, Solas, & Carballo, 1994; Katsaras & Peetz, 1989).

The morphology of the reformulated frankfurters indicates that the characteristics of the continuous protein matrix and the fat globules are affected by the type of oil-in-water emulsions used in the product formulation. Thus, the matrix generally becomes disorganized and loses some of its spongy appearance (few cavities), showing a more continuous and compact structure. This is particularly apparent in samples F/SC and F/SPI (For sample formulation see Table 2) (Fig. 1b–c). The microstructure of sample (F/SPI + SC + MTG) (For sample formulation see Table 2) formulated with oil-in-water emulsions stabilized using MTG (Fig. 1d) revealed more of a spongy structure (as compared with F/SC and F/SPI), with more cavity formation but was clearly morphologically different (generally smaller) from the control. Similar findings on microstructure have been reported using olive-oil-in-water emulsions as pork backfat replacers (Jiménez-Colmenero, Herrero, Pintado, Solas, & Ruiz-Capillas, 2010), these morphological differences were attributed to variations in the physicochemical characteristics of the oil-in-water emulsions. The morphological characteristics observed in the frankfurters containing the healthier oil combination conferred greater consistency on the product and promoted textural changes, so that these were harder and chewier than the control sample. However the physicochemical characteristics of the oil-in-water had no clear effect on textural properties of the frankfurters (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Solas, et al., 2010). Since all the frankfurters had very similar compositions (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010), other factors associated with the nature

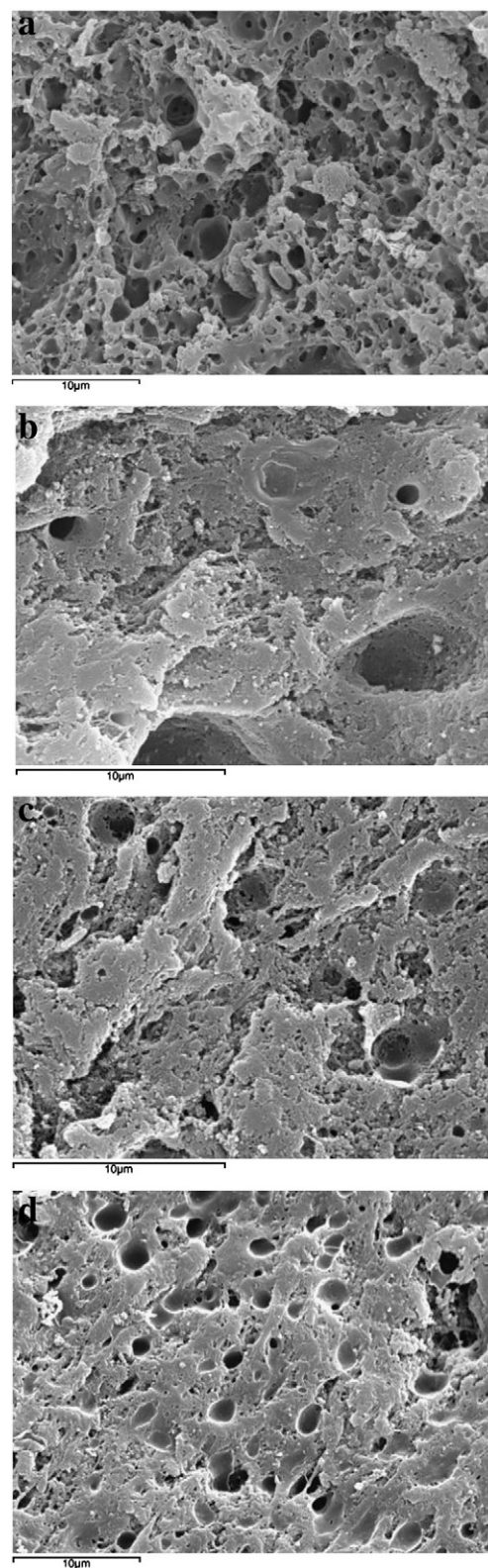


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the different frankfurters: a) Control: frankfurter formulated with pork backfat; b) F/SC, frankfurter formulated with oil-in-water emulsion (prepared with sodium caseinate—SC), as pork backfat replacer; c) F/SPI frankfurter formulated with oil-in-water emulsion (prepared with soy protein isolate—SPI) as pork backfat replacer; d) F/SPI + SC + MTG frankfurter formulated with oil-in-water emulsion (prepared with SPI, SC and microbial transglutaminase—MTG) as pork backfat replacer. Bar represents 10 µm.

of the matrix and dependent on meat batter characteristics must be implicated in the morphology–texture relationship (Carballo, Fernández, et al., 1996), in this case the type of lipid materials. Similar microstructural results have been reported (Cáceres, García, & Selgas, 2008) as a result of addition of pre-emulsified fish oil (with caseinates) to bologna-type sausage.

3.2. Lipid oxidation

Lipid oxidation is a major cause of deterioration in the quality of stored meat products. One of the main potential problems associated with healthier lipid formulations in meat products is how they may influence the rate and extent of lipid oxidation, which in turn affects quality characteristics and has health implications. There are a number of factors determining the scale of this phenomenon. Susceptibility to lipid oxidation can be augmented by increasing concentrations of unsaturated fatty acids (particularly polyunsaturated), and also by some processing conditions like grinding, cooking, drying, etc. which entail exposure to high temperatures, decompartmentalization of pro-oxidants and anti-oxidants or enhanced access of oxygen to the substrate (Lee, Choi, & Moon, 2006).

TBARS values were affected ($P < 0.05$) by the formulation and storage (Table 3), with interaction ($P < 0.05$) between both factors. From the outset of storage TBARS values were higher ($P < 0.05$) in the reformulated samples than in the control (Table 3), indicating a higher rate and a greater extent of lipid oxidation in healthier lipid frankfurters (with higher levels of unsaturates). As reported previously (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010), in the experimental conditions frankfurters produced with oil combinations had lower levels of saturated fatty acids (SFA) (19.3%), similar levels of MUFA (46.9%) and higher levels of PUFA (33.6%) than control frankfurters (all pork fat) (39.3, 49.5 and 10.6% respectively). PUFA/SFA and n-6/n-3 PUFA ratios in control sample were 0.27 and 9.27; in reformulated frankfurters the PUFA/SFA ratio was higher (1.7) and the n-6/n-3 PUFA ratio was lower (0.47). However, in these products the lipid oxidation varied according to the type of systems used to stabilize the oil (healthier lipid combination)-in-water emulsions used as pork backfat replacers (Table 2). For instance, the use of SPI + SC + MTG produced the highest oxidation levels at all times throughout storage. Except in sample F/SPI + SC + MTG, the TBARS value increased ($P < 0.05$) over storage time (up to day 13 for control and day 27 for F/SC and F/SPI), then decreased as from day 41. Thus, lipid oxidation was greater when MTG was included in the stabilization system of oil-in-water emulsion. The pattern of TBARS behavior during storage (a peak followed by a decline of the TBARS value) has been reported during frozen storage of ground beef (Bhattacharya, Hanna, & Mandigo, 1988; Brewer & Wu, 1993). It has been suggested that the decline in TBARS values may have been due to the formation of malonaldehyde as an intermediate product; up to a certain time, the rate of malonaldehyde formation was greater than the rate of disappearance of the product, and after that point the reverse was true. Thus, the rate of disappearance exceeded the rate of formation and hence the TBARS values decreased (Bhattacharya et al.,

1988). Similarly, Jamora and Rhee (2002) reported that the malonaldehyde formed during storage of meat products might have undergone intermolecular reactions (polymerization) and reactions with other constituents, especially amino acids/proteins. Therefore the rate of malonaldehyde loss/disappearance during storage may have exceeded the rate of production through lipid oxidation.

Lipid oxidation in healthier fat meat product formulations varies according to the nature of the product, the type, amount and means of addition of non-meat fats, and the anti-oxidative system used to control rancidity development (Jiménez-Colmenero, 2007). Generally no specific problems have been reported in connection with oxidative stability in gel/emulsion meat based products formulated with healthier lipid profiles. This fact has been put down to a variety of factors: the presence of a curing mixture ingredient containing substances such as nitrite, phosphate or ascorbate which act as anti-oxidants (Márquez, Ahmed, West, & Johnson, 1989); the natural presence of various anti-oxidant substances (tocopherols, phenolic compounds) in the plant oils used – for example olive oil (Bloukas, Paneras, & Fournitzis, 1997a) or corn oil (Bishop et al., 1993) – or finally the absence of phospholipids in refined oils (Bishop et al., 1993). Cáceres et al. (2008) reported a low level of lipid oxidation (TBARS value of 0.37–0.52 mg MDA/kg) during chilling of bologna-type sausage prepared with fish oil. In the present experiment, although the use of a healthier oil combination to replace animal fat in frankfurter formulation promoted slightly (but significantly over storage) more lipid oxidation than in the control sample (Table 3), the observed TBARS values (< 0.5 mg/kg in all samples except F/SPI + SC + MTG, where it was < 0.8) were lower than those described as the minimum needed to detect objectionable flavors in processed meat products (Cáceres et al., 2008; Liu, Lee, & Damodaran, 1999; Mercadante, Capitani, Decker, & Castro, 2010).

Comminuted meat systems contain salt and relatively high concentrations of unsaturated fat. When subjected to thermal treatment, they become prone to lipid oxidation behavior associated (among other factors) with the pro-oxidative activity of non-heme iron, which catalyzes lipid oxidation in this biological tissue (Bastida et al., 2009). There are several factors that may be implicated in the relatively low lipid oxidation of healthier reformulated frankfurters like the ones studied in this experiment. One may be related to the combined effect of the anti-oxidants used in sausage manufacture (nitrite) and included in the vegetable and fish (combination of tocopherols) oils used in product manufacture. Another may be related to the protective effect of sodium caseinate and soy protein isolate against lipid oxidation in oil-in-water emulsions through a combination of free radical scavenging and/or metal chelation (Faraji, McClements, & Decker, 2004). It has been reported that SPI has greater oxidative stability than SC, since other anti-oxidants associated with this protein (such as the isoflavone) could also act as anti-oxidants (Faraji et al., 2004). This would help to explain the lower rate of lipid oxidation in F/SPI frankfurter as compared to F/SC (Table 3), while the fact that oxidative activity was greatest in F/SPI + SC + MTG sample could be related to interference by transglutaminase in any of the anti-oxidative mechanisms of those proteins, limiting their ability to inhibit lipid oxidation. This effect may be more pronounced with SC (Table 3) since this protein appears to be a better substrate for MTG (formation of microbial transglutaminase-catalyzed protein cross-linking) than soy protein (Motoki & Seguro, 1998).

3.3. Residual nitrite

Recently, interest in nitrite and its reaction has re-emerged because of its implications for human health (Cassens, 1997). Residual nitrite was affected ($P < 0.05$) by the formulation and storage (Table 4), with interaction ($P < 0.05$) between both factors. As expected, residual nitrite levels decreased over storage in all samples. Only 51–61% of the added nitrite was detectable in the final product

Table 3
Lipid oxidation (TBARS values, expressed as mg MDA/kg sample) of frankfurters during chilling storage.

Sample	Storage (days)			
	1	13	27	41
Control	0.037 ± 0.018 ^{aA}	0.120 ± 0.015 ^{aC}	0.064 ± 0.009 ^{aB}	0.022 ± 0.010 ^{aA}
F/SC	0.164 ± 0.022 ^{cA}	0.424 ± 0.023 ^{cB}	0.498 ± 0.011 ^{cC}	0.419 ± 0.005 ^{cB}
F/SPI	0.102 ± 0.012 ^{bA}	0.352 ± 0.011 ^{bC}	0.400 ± 0.013 ^{bD}	0.313 ± 0.023 ^{bB}
F/SPI + SC + MTG	0.296 ± 0.050 ^{dA}	0.625 ± 0.024 ^{dB}	0.756 ± 0.013 ^{dC}	0.754 ± 0.006 ^{dC}

For sample formulation see Table 2. Mean ± SD. Different letters in the same column (a, b, c...) and in the same row (A, B, C...) indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 4
Concentration of residual nitrite (mg/kg of sample) in frankfurters during chilling storage.

Samples	Storage (days)			
	1	13	27	41
Control	62.80 ± 3.26 ^{ad}	53.17 ± 0.39 ^{ac}	46.93 ± 0.34 ^{ab}	21.16 ± 0.79 ^{aA}
F/SC	68.57 ± 0.86 ^{bd}	62.69 ± 0.41 ^{bc}	56.09 ± 0.33 ^{bB}	50.18 ± 0.44 ^{bA}
F/SPI	71.01 ± 1.25 ^{cd}	64.49 ± 0.51 ^{bb}	55.23 ± 0.63 ^{bA}	54.41 ± 0.42 ^{cA}
F/SPI + SC + MTG	73.24 ± 1.77 ^{dc}	67.78 ± 0.00 ^{cb}	57.31 ± 1.25 ^{cA}	55.54 ± 1.91 ^{cA}

For sample formulation see Table 2. Mean ± SD. Different letters in the same column (a, b, c,...) and in the same row (A, B, C,...) indicate significant differences ($P < 0.05$).

after processing and 17–46% after storage for 41 days at 2 °C (Table 4). Of the healthier lipid formulations, F/SPI + SC + MTG frankfurter had the highest ($P < 0.05$) residual nitrite level over storage. Many studies have demonstrated that the added nitrite is rapidly depleted in meat products since nitrite reacts with or binds to constituents (lipids, proteins, etc.) of the meat (Carballo, Cavestany, & Jiménez-Colmenero, 1991; Cassens, Greaser, Ito, & Lee, 1979; EFSA, 2003). The rate of loss of nitrite in a product is dependent on a number of factors including the heat process used, the pH of the product, the storage temperature and the addition of ascorbic acid or other reducing agents (Cassens, 1997; EFSA, 2003). In our experimental conditions the lipid material is the main differences in sample formulations (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010) and the nitrite reacts with lipid components of meat (Cassens et al., 1979), and therefore the lipid profile can be related to the differences in the residual nitrite behavior in frankfurters. Several studies have reported the influence of aspects associated with the content and characteristics of the lipid in meat products. Higher residual nitrite levels have been reported in low-fat sausages as compared with high-fat products (Ayo et al., 2007; Jiménez-Colmenero, Carballo, Fernandez, Cofrades, & Cortes, 1997; Jiménez-Colmenero et al., 2010; Jiménez-Colmenero, Herrero, et al., 2010). Unlike the present experiment (Table 4), others have reported that replacement of pork fat by olive oil reduced the residual nitrite as compared with all pork fat samples (López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jiménez-Colmenero, 2009). However, Paneras and Bloukas (1994) found no differences in the nitrite content of frankfurters with vegetable oils.

3.4. Microbiological analysis

Microbiological considerations during chilling storage are known to affect the stability and shelf life of meat products, but there has been hardly any research on reformulated meat products with oils added (Bloukas, Paneras, & Fournitzis, 1997b). Microbial counts were affected by the storage and formulation (Fig. 2). The initial levels of TVC were very low (< 3 Log cfu/g) in all samples (Fig. 2a). This flora consisted mainly of LAB (Fig. 2b), which traditionally predominate in vacuum-packed cooked meat products (Andrés, García, Zaritzky, & Califano, 2006; Holley, 1997; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007). *Enterobacteriaceae* levels were lower than 1 Log cfu/g over storage. The levels of these microorganisms were within the legal limits and comparable to those detected in other assays on frankfurter and bologna (Andrés et al., 2006; Holley, 1997; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007). This result shows that the mode of product preparation follows good manufacturing practice.

The microbiological changes taking place in stored low-fat frankfurters were most noticeable in F/SC and F/SPI products. The greatest increase in microorganism growth in F/SC and F/SPI products was observed after 27 days, when TVC values exceeded 5 Log cfu/g and LAB levels exceeded 4 Log cfu/g. These were also the products that presented the highest microorganism levels at the end of storage, contrasting with F/SPI + SC + MTG and control samples, where

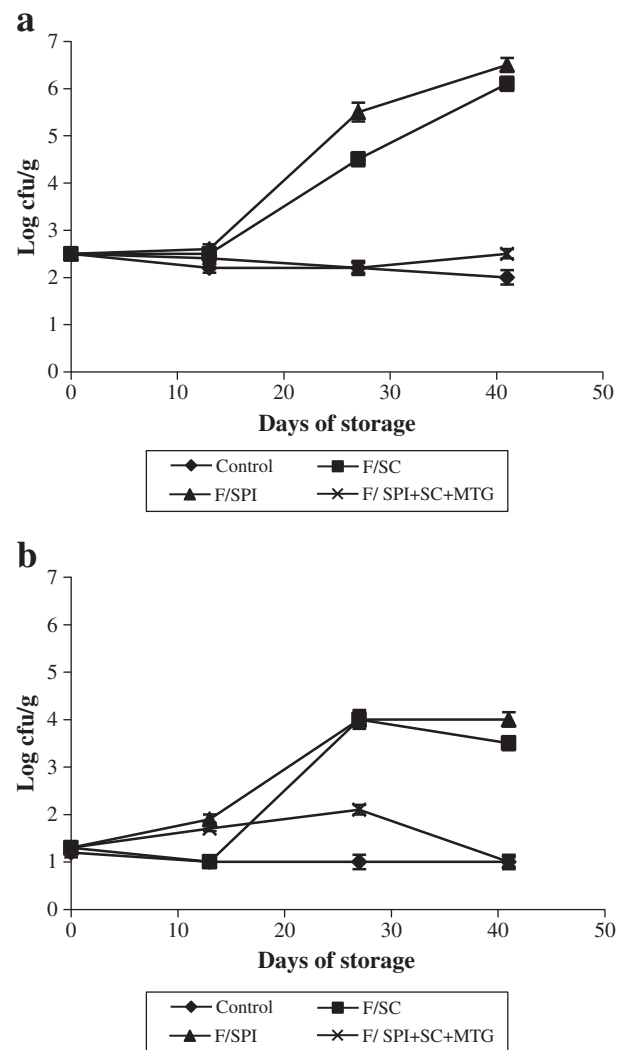


Fig. 2. Microorganism counts (a: Total viable count, b: Lactic acid bacteria) in frankfurters during chilling storage. Control: frankfurter formulated with pork backfat; F/SC, frankfurter formulated with oil-in-water emulsion (prepared with sodium caseinate—SC), as pork backfat replacer; F/SPI frankfurter formulated with oil-in-water emulsion (prepared with soy protein isolate—SPI) as pork backfat replacer; F/SPI + SC + MTG frankfurter formulated with oil-in-water emulsion (prepared with SPI, SC and microbial transglutaminase—MTG) as pork backfat replacer.

microorganism levels remained low (< 3 Log cfu/g). Similarly, Ruiz-Capillas, Carballo, and Jiménez-Colmenero (2007) reported no changes in the low microorganism levels in vacuum-packed frankfurter until day 48 of chilling storage at 2 °C. Andrés et al. (2006) reported microorganism levels of less than 7 Log cfc/g in low fat chicken after 50 days of chilling storage at 4 °C. According to these authors, low fat associated with high moisture provides a better environment for bacterial growth. Bloukas et al. (1997b), observed similar microbial behavior to that reported in the present experiment in low fat frankfurters with olive oil during chilling storage.

Processing (thermal treatment and storage (vacuum-packed, at 2 °C)) conditions account for the fact that the microbial quality of these products was generally adequate.

3.5. Biogenic amines

Biogenic amines (BA) occur in a wide range of foods, among them meat and meat products. These compounds are of interest for two reasons: firstly as possible quality indicators, and secondly because high levels of dietary BA can present a toxic risk to certain consumers (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004). There are numerous

Table 5
Biogenic amines content (mg/kg) in frankfurters during chilled storage.

Biogenic amines	Sample	Storage (days)			
		1	13	27	41
Tyramine	Control	2.48 ± 0.53 ^{aA}	2.57 ± 0.29 ^{bA}	2.08 ± 0.22 ^{bA}	1.86 ± 0.03 ^{aBC}
	F/SC	2.32 ± 0.49 ^{aC}	1.67 ± 0.02 ^{aAB}	1.28 ± 0.10 ^{aA}	3.46 ± 0.15 ^{9BB}
	F/SPI	2.41 ± 0.28 ^{aB}	2.07 ± 0.19 ^{abAB}	1.82 ± 0.02 ^{abA}	5.65 ± 0.05 ^{cC}
	F/SPI + SC + MTG	1.93 ± 0.31 ^{aA}	2.17 ± 0.22 ^{abA}	2.12 ± 0.07 ^{bA}	1.80 ± 0.02 ^{aA}
Phenylethylamine	Control	7.97 ± 0.11 ^{bD}	5.68 ± 0.03 ^{bC}	1.78 ± 0.01 ^{aA}	2.96 ± 0.06 ^{aB}
	F/SC	9.68 ± 0.29 ^{cC}	5.81 ± 0.03 ^{bB}	13.31 ± 0.16 ^{dD}	5.01 ± 0.22 ^{cA}
	F/SPI	7.21 ± 0.02 ^{aC}	5.87 ± 0.07 ^{bB}	8.14 ± 0.16 ^{cD}	3.37 ± 0.02 ^{bA}
	F/SPI + SC + MTG	9.60 ± 0.07 ^{cD}	4.81 ± 0.01 ^{aB}	2.40 ± 0.21 ^{bA}	7.11 ± 0.05 ^{dC}
Histamine	Control	1.45 ± 0.06 ^{aC}	0.90 ± 0.05 ^{aB}	0.00 ± 0.00 ^{aA}	0.08 ± 0.01 ^{aA}
	F/SC	2.15 ± 0.01 ^{bC}	0.97 ± 0.08 ^{aB}	2.95 ± 0.47 ^{cD}	0.39 ± 0.04 ^{aA}
	F/SPI	1.27 ± 0.04 ^{abC}	0.98 ± 0.07 ^{aB}	1.56 ± 0.24 ^{bC}	0.12 ± 0.01 ^{aA}
	F/SPI + SC + MTG	2.22 ± 0.00 ^{bD}	0.69 ± 0.05 ^{aB}	0.08 ± 0.01 ^{aA}	1.05 ± 0.01 ^{bC}
Cadaverine	Control	1.18 ± 0.06 ^{bA}	2.01 ± 0.34 ^{bB}	2.82 ± 0.34 ^{bC}	3.57 ± 0.21 ^{aD}
	F/SC	1.53 ± 0.10 ^{bA}	1.94 ± 0.05 ^{bA}	3.46 ± 0.11 ^{cB}	5.33 ± 0.06 ^{bC}
	F/SPI	1.15 ± 0.07 ^{bA}	2.46 ± 0.30 ^{cB}	3.71 ± 0.31 ^{cC}	5.90 ± 0.10 ^{cD}
	F/SPI + SC + MTG	0.38 ± 0.02 ^{aA}	0.85 ± 0.01 ^{aB}	1.85 ± 0.06 ^{aC}	3.89 ± 0.06 ^{aD}
Agmatine	Control	7.06 ± 0.01 ^{aBC}	6.66 ± 0.07 ^{aA}	7.04 ± 0.03 ^{aB}	7.22 ± 0.02 ^{aC}
	F/SC	9.37 ± 0.24 ^{dC}	9.17 ± 0.09 ^{dB}	8.90 ± 0.03 ^{cA}	8.96 ± 0.07 ^{cA}
	F/SPI	8.17 ± 0.04 ^{cAB}	8.06 ± 0.01 ^{cA}	8.60 ± 0.03 ^{bC}	8.31 ± 0.05 ^{bB}
	F/SPI + SC + MTG	7.25 ± 0.00 ^{bB}	7.51 ± 0.07 ^{bC}	7.03 ± 0.05 ^{aA}	7.20 ± 0.05 ^{aAB}
Spermidine	Control	0.78 ± 0.07 ^{bB}	0.69 ± 0.01 ^{bB}	0.59 ± 0.16 ^{bAB}	0.48 ± 0.01 ^{aA}
	F/SC	0.52 ± 0.02 ^{aA}	0.37 ± 0.09 ^{aA}	0.37 ± 0.00 ^{aA}	0.51 ± 0.04 ^{aA}
	F/SPI	0.50 ± 0.03 ^{aA}	0.73 ± 0.01 ^{bB}	0.78 ± 0.01 ^{cBC}	0.92 ± 0.01 ^{bC}
	F/SPI + SC + MTG	0.55 ± 0.19 ^{aA}	0.62 ± 0.13 ^{bA}	0.53 ± 0.07 ^{abA}	0.85 ± 0.02 ^{bB}
Spermine	Control	20.55 ± 0.07 ^{abAB}	19.32 ± 0.23 ^{aA}	21.04 ± 0.91 ^{bB}	20.48 ± 0.98 ^{aAB}
	F/SC	21.68 ± 0.52 ^{bA}	21.28 ± 0.45 ^{bA}	21.30 ± 1.05 ^{bA}	20.77 ± 0.76 ^{aA}
	F/SPI	20.05 ± 0.17 ^{aA}	19.95 ± 0.13 ^{abA}	22.24 ± 1.05 ^{bb}	21.54 ± 0.19 ^{aB}
	F/SPI + SC + MTG	19.36 ± 0.04 ^{aA}	19.58 ± 0.37 ^{aAB}	19.40 ± 0.69 ^{aA}	20.94 ± 0.38 ^{aB}

For sample formulation see Table 2. Mean ± SD. Different letters in the same column (a, b, c...) and in the same row (A, B, C...) indicate significant differences ($P < 0.05$).

studies of BA in meat products (fresh, fermented, cooked, etc.) (Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007), but the authors know of no studies that analyze the formation of BA in healthier lipid meat products. Factors associated with the reformulation process (ingredient modifications, handling conditions, etc.) decisively influence the factors responsible for the formation of BA such as microorganisms (Lactic acid bacteria, *enterobacteriaceae*, and *micrococaceae*), pH, free amino acids, etc., and hence their profile and final concentrations. It is essential to understand how BA formation is affected by the reformulation process in order to assess its potential presence in these healthy meat products.

BA contents in frankfurters (Table 5) were affected ($P < 0.05$) by the storage and formulation, with interaction ($P < 0.05$) between both factors. Putrescine levels were very low, less than 0.5 mg/kg, in all samples. Low putrescine levels have been reported in cooked products such as frankfurters and meat batters (Ruiz-Capillas, Aller-Guiote, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2006; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007). Spermine was the most abundant BA (19–20 mg/kg), and there were generally no differences ($P > 0.05$) in levels between formulations (Table 5). One factor that may explain this is that spermine comes chiefly from the meat that is used. Similar levels of spermine have been found in frankfurters and meat batters (Ruiz-Capillas et al., 2006; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007). In the case of spermidine, initial levels were very low, <0.80 mg/kg, as compared to control sample, but levels in the reformulated products were lower ($P < 0.05$) (Table 5). There were high levels of agmatine and phenylethylamine, as is usual in meat and frankfurter-type meat products (Ruiz-Capillas et al., 2006), although the agmatine levels were lower than reported in other studies (Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007). The initial levels of tyramine and cadaverine were low (around 2 and 1 mg/kg respectively). Also low was histamine (<1 mg/kg, which is not found in appreciable quantities in meat products (Halász, Barath, Simonsarkadi, & Holzapfel, 1994; Ruiz-Capillas et al., 2006; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007; Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004).

The most appreciable changes in the course of storage occurred in tyramine and cadaverine levels, especially at the end of storage (Table 5), mainly as a consequence of microbial activity (Fig. 2). For instance, F/SC and F/SPI frankfurters, the ones with the highest TVC levels (Fig. 2), presented higher ($P < 0.05$) levels of tyramine and cadaverine at the end of storage. On the other hand, the control and F/SPI + SC + MTG samples present similar patterns to one another throughout storage (Table 5), and TVC and LAB levels were also similar (Fig. 2). Similar behavior has been reported in other experiments with frankfurters (Ruiz-Capillas et al., 2006; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007).

4. Conclusions

Low-fat frankfurters can be manufactured using a healthier oil (from plant and marine sources) combination stabilized with different non meat protein systems as pork backfat replacers, to give a product with healthy lipid content (amount and fatty acid profile). The reformulation process and chilling storage affect product characteristics such as matrix morphology, lipid oxidation, residual nitrite, microbial population and BA formation, but they do not produce safety issues or shelf-life constraints in frankfurters. This in addition to the nutritional advantages (fatty acid profile), sensory attributes and technological properties (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jimenez-Colmenero, 2010) suggests that this can be a suitable strategy for the manufacture healthier frankfurters (potential functional food).

Acknowledgements

This research was supported by projects AGL2007-61038/ALI and AGL2008-04892-CO3-01 under the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) and the Consolider-Ingenio 2010: CARNISUS (CSD2007-00016), Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- Andrés, S. C., García, M. E., Zaritzky, N. E., & Califano, A. (2006). Storage stability of low-fat chicken sausages. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 311–319.
- Ayo, J., Carballo, J., Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat Science*, 77(2), 173–181.
- Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., Olivero, R., Pérez-Ollerros, L., Ruiz-Roso, B., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chemistry*, 116(3), 748–754.
- Bhattacharya, M., Hanna, M. A., & Mandigo, R. W. (1988). Lipid oxidation in ground-beef patties as affected by time-temperature and product packaging parameters. *Journal of Food Science*, 53(3), 714–717.
- Bishop, D. J., Olson, D. G., & Knipe, C. L. (1993). Pre-emulsified corn oil, pork fat, or added moisture affect quality of reduced fat bologna quality. *Journal of Food Science*, 58, 484–487.
- Bloukas, J. G., & Paneras, E. D. (1993). Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *Journal of Food Science*, 58, 705–709.
- Bloukas, J. G., Paneras, E. D., & Fournitzis, G. C. (1997a). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 45, 133–144.
- Bloukas, J. G., Paneras, E. D., & Fournitzis, G. C. (1997b). Sodium lactate and protective culture effects on quality characteristics and shelf-life of low-fat frankfurters produced with olive oil. *Meat Science*, 45(2), 223–238.
- Brewer, M. S., & Wu, S. Y. (1993). Display, packaging, and meat block location effects on color and lipid oxidation of frozen lean ground-beef. *Journal of Food Science*, 58(6), 1219–1223.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n-3 – on microstructure and sensory properties of mortadela, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Science*, 80(2), 183–193.
- Carballo, J., Cavestany, M., & Jiménez-Colmenero, F. (1991). Effect of light on color and reaction of nitrite in sliced pork bologna under different chilled storage temperatures. *Meat Science*, 30(3), 235–244.
- Carballo, J., Fernandez, P., Barreto, G., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996). Characteristics of high- and low-fat bologna sausages as affected by final internal cooking temperature and chilling storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(1), 40–48.
- Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996). Morphology and texture of bologna sausage containing different levels of fat, starch and egg white. *Journal of Food Science*, 61, 652–655.
- Cassens, R. G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology*, 51(2), 53–55.
- Cassens, R. G., Greaser, M. L., Ito, T., & Lee, M. (1979). Reactions of nitrite in meat. *Food Technology*, 33(7), 46–57.
- Cavestany, M., Jiménez-Colmenero, F., Solas, M. T., & Carballo, J. (1994). Incorporation of sardine surimi in bologna sausage containing different fat levels. *Meat Science*, 38(1), 27–37.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jimenez-Colmenero, F. (2010). Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 859–870.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: An approach for the development of functional meat products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7), 791–801.
- Djordjevic, D., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part B). *Journal of Food Science*, 69, C356–C362.
- EFSA (2003). The effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal*, 14, 1–31.
- Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558–4564.
- García-Iníguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M. I., Cavero, R. Y., Navarro-Blasco, I., et al. (2010). Selenium, iodine, omega-3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: A combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science*, 85(2), 274–279.
- Halász, A., Barath, A., Simonsarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic-amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42–49.
- Holley, R. A. (1997). Asymmetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham and bologna. *Journal of Food Protection*, 60(5), 510–519.
- Jamora, J. J., & Rhee, K. S. (2002). Storage stability of extruded products from blends of meat and nonmeat ingredients: Evaluation methods and antioxidative effects onion, carrot, and oat ingredients. *Journal of Food Science*, 67(5), 1654–1659.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 567–578.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Fernandez, P., Cofrades, S., & Cortes, E. (1997). Retail chilled display storage of high- and reduced-fat sliced bologna. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1099–1104.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Solas, M. T. (1995). The effect of use of freeze-thawed pork on the properties of Bologna sausages with two fat levels. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 345–355.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., & Solas, M. T. (2010). Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Science*, 84(3), 356–363.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Pintado, T., Solas, M. T., & Ruiz-Capillas, C. (2010). Influence of emulsified olive oil stabilizing system used for pork backfat replacement in frankfurters. *Food Research International*, 43, 2068–2076.
- Katsaras, K., & Peetz, P. (1989). Morphological-changes in dark cutting beef when heated. *Fleischwirtschaft*, 69(6), 1043–1045.
- Lee, H. A., Choi, S. J., & Moon, T. W. (2006). Characteristics of sodium caseinate-and soy protein isolate-stabilized emulsion-gels formed by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 71, C352–C357.
- Liu, M., Lee, D., & Damodaran, S. (1999). Emulsifying properties of acidic sub-units of soy 11S globulin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 4970–4975.
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83(1), 148–154.
- López-López, I., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Science*, 83(2), 255–262.
- Márquez, E. J., Ahmed, E. M., West, R. L., & Johnson, D. D. (1989). Emulsion stability and sensory quality of beef frankfurters produced at different fat and peanut oil levels. *Journal of Food Science*, 54(867–870), 873.
- Mercadante, A. Z., Capitani, C. D., Decker, E. A., & Castro, I. A. (2010). Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. *Meat Science*, 84(4), 718–726.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 204–210.
- Paneras, E. D., & Bloukas, J. G. (1994). Vegetable-oils replace pork backfat for low-fat frankfurters. *Journal of Food Science*, 59(4), 725–728.
- Paneras, E. D., Bloukas, J. G., & Filis, D. G. (1998). Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *Journal of Muscle Foods*, 9, 111–126.
- Park, J., Rhee, S. K., Keeton, J. T., & Rhee, K. C. (1989). Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils. *Journal of Food Science*, 54(3), 500–504.
- Ruiz-Capillas, C., Aller-Guote, P., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2006). Biogenic amine formation and nitrite reactions in meat batter as affected by high-pressure processing and chilled storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9959–9965.
- Ruiz-Capillas, C., Aller-Guote, P., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. *Food Chemistry*, 101(2), 812–816.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Consequences of high-pressure processing of vacuum-packaged frankfurters on the formation of polyamines: Effect of chilled storage. *Food Chemistry*, 104(1), 202–208.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7–8), 489–499.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, 66(7), 1030–1032.
- Serrano, A., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2006). Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat Science*, 72(1), 108–115.

***IV.1.4. A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients
in low-fat pork liver pâté***

Meat Science, 2011, 88, 241-248



A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté

G. Delgado-Pando, S. Cofrades, L. Rodríguez-Salas, F. Jiménez-Colmenero *

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. (Formerly Instituto del Frío) (CSIC). Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2010

Received in revised form 13 December 2010

Accepted 15 December 2010

Keywords:

Pâté

Healthier oil combination

Konjac gel

Fatty acid profile

Physicochemical properties

Sensory analysis

ABSTRACT

Healthier lipid pâtés were formulated by reducing the fat content and/or replacing the pork backfat by a healthier oil combination (olive, linseed and fish oils) and konjac gel (0–15%). The reformulation results were evaluated by composition (proximate analysis and fatty acid profile), technological properties (emulsion stability, colour, and texture), microbiological and sensory parameters of the pâtés. Pâtés with partial or total replacement of pork backfat had lower levels of saturated fatty acids (SFA) (27.4% and 21.3%) and monounsaturated fatty acids (MUFA) (49.8% and 42.5%), and higher levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (22.4% and 35.6%) compared with control pâtés (32.2%, 58.2% and 9.04% respectively). The n–6/n–3 PUFA ratio was decreased from 6.78 (in control pâtés) to 0.79 and 0.48 when partial and total pork backfat respectively was replaced by a healthier oil combination. Although emulsion stability was affected by the formulation, in general all pâtés had good fat and water binding properties. The fat reduction produced a softer and more spreadable pâté, although no effect on penetration parameters was observed after by pork fat replacement by a healthier oil combination. The addition of 15% of konjac gel produced stiffer structures (as compared with 0 and 7%) which are very close to those of the control samples. No microbiological limitations were produced by the reformulation process, obtaining pâtés with acceptable sensory characteristics, similar to the control sample.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pâté is a very popular and cheap cooked meat product manufactured worldwide. In some countries liver pâtés are traditional products with good sensory properties, which form part of the gastronomic culture, with high levels of consumption as in e.g. Spain, France, Germany and Denmark (Fernández-López, Sayas-Barberá, Sendra, & Pérez-Álvarez, 2004; Martín, Antequera, Muriel, Pérez-Palacios, & Ruiz, 2009). However, these products present some negative health concerns related to their high fat (between 25 and 40%) and energy contents (around 300–400 kcal/100 g) and the fatty acid profiles of animal fat. As in other meat products with similar characteristics, pâté reformulation processes have been used to achieve better lipid compositions by reducing the fat content and/or replacing the animal fat normally present in the product with another fat with characteristics more in line with health recommendations. The rationale behind lipid modification to improve consumer health is that reducing saturated fatty acid (SFA) concentrations and increasing monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) contents, especially n–3 PUFA, will reduce the n–6/n–3 PUFA ratio (Simopoulos, 2002; WHO, 2003).

A number of studies have been conducted to reduce fat and improve the fatty acid profile in pâté. Pork backfat replacement by muscle was used to reduce the fat content from normal (31%) to medium (26%) and low (20%) levels (Estévez, Ventanas, & Cava, 2005a). Globin and plasma have been used as fat replacements, reducing the fat content in ham pâté from 25 to 16% (Viana, Silva, Delvivo, Bizzotto, & Silvestre, 2005). Very low fat (3%) liver pâté and ham pâté were produced with potato flour as fat substitute (Kaack & Pedersen, 2005). Pork liver pâté (with 39% fat content) with a healthier n–6/n–3 PUFA ratio has been manufactured using backfat and meat enriched with n–3 PUFA, obtained from pigs fed on linseed oil-enriched diets (D'Arrigo et al., 2004). Very low fat (2%) liver pâté from pigs fed on conjugated linoleic acid (CLA) and MUFA was produced without pork lard in the formulation (Martín et al., 2009). Partial replacement of pork fat by CLA and/or olive oil (rich in oleic acid) or soybean oil (with high PUFA) has been used to produce liver pâté (with 24–29% fat content) or spreadable liver sausage (30–32% fat content), respectively (Hong, Lee, & Min, 2004; Martín, Ruiz, Kivikari, & Puolanne, 2008).

The addition of individual lipids (of plant or marine origin) does improve the fatty acid profile of meat products, but a better approximation to an optimal lipid profile from a health standpoint can be achieved using healthier oil combinations as animal fat replacers (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Solas, & Jiménez-Colmenero, 2010b; García-Iníguez de Ciriano et al., 2010; López-López, Cofrades,

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail address: fjimenez@if.csic.es (F. Jiménez-Colmenero).

Ruiz-Capillas, & Jiménez-Colmenero, 2009; Paneras, Bloukas, & Filis, 1998). In a previous paper (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jiménez-Colmenero, 2010a) the suitability of oil (healthier lipid combination)-in-water emulsion as pork backfat replacement in frankfurters was assessed. The healthier lipid combination was formed by vegetable oils (olive and linseed) and fish oils in suitable amounts and proportions to provide a fatty acid profile adjusted to healthier intake goals. This oil combination was designed to produce a lipid material with a small proportion of SFA, large proportions of MUFA and PUFA (including long chain n-3 PUFA) and balanced n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios (Delgado-Pando et al., 2010b). As far as we are aware, the use of a healthier oil combination as a functional ingredient in the development of low-fat pâté has not been explored.

Since the processes of reduction and replacement of animal fat with other more unsaturated fats may have implications for the technical and sensorial properties, different strategies have been used to moderate their consequences. Konjac glucomannan is a neutral polysaccharide produced from the tuber *Amorphophallus konjac*. It is widely used in Asia, where it has been known for centuries. The interest of this ingredient lies in its important technological properties (water retention capacity and as a gelling and thickening agent) and potential health implications (e.g. reducing cholesterol, insulin and glucose levels or its satiating and laxative effect). This is why its use as a fat substitute has been tested in low-fat meat products such as frankfurter or bologna sausage (Chin, Keeton, Miller, Longnecker, & Lamkey, 2000; Jiménez-Colmenero et al., 2010; Kao & Lin, 2006; Lin & Huang, 2003, among others). We are not aware of its application to pâté-type products.

Although many studies relate to developing healthier lipid formulations in meat products based on processing strategies (Jiménez-Colmenero, 2007), there are very few related to pâtés, particularly with simultaneous tests reducing fat content and replacing the animal fat with another fat which is more compatible with health recommendations. The aim of this paper is to evaluate the nutritional and technological results of a reformulation process for pâtés to produce better lipid compositions by reducing the fat content and/or replacing the pork backfat by an oil (healthier lipid combination)-in-water emulsion and konjac gel in different proportions. The healthier lipid combination was formed by vegetable (olive and linseed) and fish oils in suitable amounts and proportions to provide a fatty acid profile adjusted to healthier intake goals (Delgado-Pando et al., 2010b).

2. Materials and methods

2.1. Materials, oil-in-water emulsion and konjac gel preparation

Fresh post-rigor pork meat (mixture of *M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. gracilis* and *M. adductor*) (21.2% and 2.2% protein and fat content, respectively), Iberian pork backfat (3.2% protein, 88.7% fat) and pork liver (21% protein, 5% fat) were obtained from a local market. The visible fat was separated from the meat and this was minced with a 0.4 mm mincer plate. The minced meat, fat and liver were vacuum packed and frozen at -20°C until used (not more than 14 days later).

An oil-in-water emulsion (O/SPI) was prepared from the following ingredients: olive oil (Carbonell Virgen Extra, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain), linseed oil (Natursoy S.L., Alimentos Ecológicos, Castellterçol, Spain) and fish oil (Omevital 18/12 TG Gold, Cognis GMBH, Illertissen, Germany), containing according to the producer 160 mg eicosapentaenoic acid (EPA)/g and 115 mg docosahexaenoic acid (DHA)/g; and soy protein isolate (SPI) containing 92.1% protein (Vicoprot, TRADES S.A., Barcelona, Spain). The oil-in-water emulsion was prepared with a 52.63% oil combination (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil), 42.11% water and 2.26% SPI, following the procedure

described by Delgado-Pando et al. (2010a). The oil-in-water emulsion was produced the day before it was used and stored at $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

The konjac gel (KG) was prepared with konjac flour (glucomannan 83%, 120 mesh, Trades S.A., Barcelona, Spain), i-carrageenan (Secolata IP, Hispanagar, Burgos, Spain), pre-gelled corn starch (Amigel, Julio Criado S. L. Madrid, Spain), and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Panreac Química S. A. Barcelona, Spain), following the procedure described by Jiménez-Colmenero et al. (2010).

Other ingredients and additives used were sodium chloride and sodium ascorbate (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain), sodium tripolyphosphate (STP) (Manuel Riesgo, S.A. Madrid, Spain), sodium nitrite (Fulka Chemie GMBH, Buchs, Germany), sodium caseinate containing 86.4% protein (Julio Criado Gómez SA, Alcorcón, Spain), milk powder (Antonio Villoria S.A., Arganda del Rey, Spain) and flavouring (Gewürzmüller, GMBH, Münichingen, Germany).

2.2. Preparation of pâté

Eight different batches of pâtés were formulated (Table 1): two control samples—one with normal (30%) fat content (NFC30) similar to the commercial product and another with low (15%) fat content (LFC15). Three low fat (15%) samples were also formulated with partial substitution of pork backfat by the oil-in-water emulsion and with the addition of konjac gel in different proportions: 0% (LFPO-K0), 7.5% (LFPO-K7) and 15% (LFPO-K15). Finally three other low fat (15%) samples were formulated, with total substitution of pork backfat by oil-in-water emulsion and with the addition of different proportions of konjac gel: 0% (LFTO-K0), 7.5% (LFTO-K7) and 15% (LFTO-K15). At a compositional level, the experimental design for improving the fat content of these products is related to fat reduction and to improving the fatty acid profile, while keeping the meat protein level constant (12%).

The meat, liver and backfat were all thawed before use (18 h at $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$). The meat, fat and oil-in-water emulsion were heated in a water bath at 85°C for 30–35 min and the water to be added was heated to 60°C . Meanwhile the chopped liver was placed in a mincer/homogenizer (Stephan Universal Machine UM5, Stephan u. Söhne GMBH and Co., Hameln, Germany), and homogenized for 1 min. Then the sodium chloride, sodium nitrite, sodium tripolyphosphate were added (the last two previously dissolved in some of the added water), along with the milk powder, sodium caseinate, sodium ascorbate, flavouring and konjac (depending on the formulation), and homogenized for 1 min. The hot meat was then added and the mixture homogenized again for 1 min. Then the hot backfat and/or oil-in-water emulsion (depending on the formulation) were mixed for 1 min and for 3 min more (under vacuum conditions) after finally adding the hot water. The mixture

Table 1
Formulation (g) of the different pâtés manufactured.¹

Samples	Meat	Pork Liver	Pork backfat	O/SPI	Konjac gel	Water
NFC30	191.6	330	314.9	–	–	105.1
LFC15	191.6	330	145.8	–	–	274.2
LFPO-K0	191.6	330	72.9	122.8	–	224.3
LFPO-K7	191.6	330	72.9	122.8	75	149.3
LFPO-K15	191.6	330	72.9	122.8	150	74.3
LFTO-K0	191.6	330	–	245.6	–	174.4
LFTO-K7	191.6	330	–	245.6	75	99.4
LFTO-K15	191.6	330	–	245.6	150	24.4

The following were also added to each sample: 2 g/100 g milk powder, 2 g/100 g sodium chloride, 1 g/100 g sodium caseinate, 0.025 g/100 g sodium ascorbate, 0.5 g/100 g sodium tripolyphosphate, 0.015 g/100 g sodium nitrite and 0.3 g/100 g flavouring.

¹ NFC30, normal fat (30%) pâté, control sample formulated with pork backfat; LFC15, low fat (15%) pâté, control sample formulated with pork backfat; LFPO indicates low fat (15%) pâté formulated with partial pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); LFTO means low fat (15%) pâté formulated with total pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); in each case K0, K7 and K15 indicates the addition of 0%, 7.5% and 15% of konjac gel, respectively.

obtained was placed in containers (hermetically closed) and heated in a water bath at 85 °C, until it reached 80 °C at the thermal centre. The heat processing conditions were defined beforehand; in the definition process the internal temperature was monitored throughout heating by means of thermocouples inserted in various containers (product thermal centre) and connected to a temperature recorder (Yokogawa Hokuskin Electric YEM, Mod. 3087, Tokyo, Japan). When processing was complete, the pâtés were cooled in a water bath (15–18 °C), and stored under refrigeration (2 ± 2 °C) until analysis (within 48 h of preparation).

2.3. Proximate analysis and fatty acid composition

The moisture and ash contents were determined (AOAC, 2000) in triplicate. Fat content was evaluated (in triplicate) according to (Bligh & Dyer, 1959). Protein content was measured in quintuplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI).

The fatty acid composition of the pâtés was determined (in sextuplicate) by gas chromatography as reported by López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas, et al. (2009). Briefly, boron trifluoride/methanol was used for fatty acid methyl ester (FAME) preparation. A Shimadzu gas chromatograph (Model GC-2014, Kyoto, Japan) fitted with a capillary column SPTM-2330 (60 m \times 0.25 mm \times 0.2 μ m i.d.) (Supelco, Inc, Bellefonte, USA) was used with a flame ionisation detector. Injector and detector temperatures were 250 °C and 260 °C respectively, and the oven temperature was 140 °C for 5 min, raised to 240 °C at 4 °C/min and maintained for 20 min. Fatty acids were identified by comparison with a known standard FAME mixture (Supelco, Alltech Associated, Inc. Deerfield, IL, USA). The quantification of fatty acids was as reported by Delgado-Pando et al. (2010a).

Based on the FAME results, the atherogenic index (AI) and thrombogenic index (TI) were computed according to Ulbricht and Southgate (1991).

$$AI = (C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / [\sum MUFA + \sum PUFA (n-6) \text{ and } (n-3)];$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / (0.5 \times \sum MUFA + 0.5 \times \sum PUFA (n-6) + 3 \times \sum PUFA (n-3) + (n-3 \text{ PUFA}) / (n-6 \text{ PUFA})).$$

2.4. Emulsion stability

Emulsion stability (Carballo, Fernandez, Barreto, Solas, & Jiménez-Colmenero, 1996a), as cooking loss (total fluid release, TFR), was expressed as% of initial sample weight. Three determinations for each sample were carried out. The containers (27 mm diameter) containing the sample (45 g) were opened after the heat treatment and left to stand upside down for 30 min to release the exudate onto a plate that had been previously weighed. Water loss (WL) was determined as weight loss after heating the total release fluid for 16 h at 105 °C and expressed as% of initial sample weight. Fat loss (FL) was calculated as the difference between TFR and WL.

2.5. Colour measurement

Colour, CIE-LAB tristimulus values, lightness, L*; redness, a* and yellowness, b* of freshly cut internal sections of pâtés, were evaluated on a CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Business Technologies, Inc., Tokyo, Japan). Six determinations were performed from each formulation.

2.6. pH determination

The pH was determined on an 827 Metrohm pH-meter (Metrohm AG, Switzerland) at room temperature on homogenates of pâtés in

water in a ratio 1:10 (w/v). Six determinations were performed for each sample.

2.7. Penetration test

The analysis was performed in a TA-XT.plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY) as follows. The penetration test was carried out at room temperature (22 °C) and performed with a 6 mm diameter penetration probe linked to a 5 kg cell, at a velocity of 0.8 mm/s and for a distance of 8 mm. The rheological parameters obtained from the corresponding force–penetration curves were: slope of curve (dimensional), penetration force to rupture (N) and gel strength (mJ), defined as the area below the curve. The analyses were carried out in sextuplicate.

2.8. Microbiological analysis

Samples were prepared in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each sample, 10 g (in replicate) was taken and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 ml of peptone water (0.1%) and 0.85% NaCl (Panreac Química, S.A. Barcelona, Spain). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate Count Agar (PCA) (Merck, Germany) for total viable count (30 °C for 72 h) and Violet RedBile Glucose Agar (VRBG) (Merck, Germany) for Enterobacteriaceae (37 °C for 24 h). The results were expressed as logarithms of colony forming units per gram (log cfu/g).

2.9. Sensory analysis

The sensory analysis was performed by 16 panellists previously trained with two training sessions in the products and terminology. A hedonic scale rating test was carried out where the testers evaluated the following for each sample: flavour (0 = dislike extremely, 10 = like extremely), texture (0 = dislike extremely, 10 = like extremely), colour (0 = very pale, 10 = very dark), fatness (0 = imperceptible, 10 = very intense), hardness (0 = soft, 10 = firm) and overall acceptability (0 = dislike extremely, 10 = like extremely). The evaluation was made on a non-structured scale with fixed extremes. Each point was later converted to a numerical scale.

2.10. Statistical analysis

Each product was prepared in duplicate. The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples. Data were analysed using PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc, Chicago, USA) for one-way ANOVA. Least squares differences were used for comparison of mean values between treatments and Tukey's HSD test to identify significant differences ($P < 0.05$) between formulations.

3. Results and discussion

3.1. Proximate analysis and energy content

The differences in formulation (Table 1) produced significant changes in the proximate composition of the pâtés (Table 2). Significant differences ($P < 0.05$) between the moisture of the normal fat sample (NFC30, 50.1%) and the low-fat samples ranged between 62.8% and 66.2%. The fat content of the different samples met the target level: the normal fat control sample (NFC30) had 30.8%, while the low-fat samples were near 15%, with no significant differences ($P > 0.05$) between them (Table 2). While in both control samples (normal fat-NFC30 and low-fat-LFC15) the fat content is mainly from pork backfat, in the other samples where the pork backfat had been partially replaced (LFPO-K0, LFPO-K7 and LFPO-K15) or totally

Table 2
Proximate analysis (%) and energy content (kcal/100 g) in pâtés.

	NFC30	LFC15	LFPO-K0	LFPO-K7	LFPO-K15	LFTO-K0	LFTO-K7	LFTO-K15
Moisture	50.08 ± 0.52 ^a	65.68 ± 0.03 ^d	66.18 ± 0.29 ^d	65.31 ± 0.15 ^d	64.30 ± 0.50 ^c	64.11 ± 0.07 ^c	63.52 ± 0.12 ^{bc}	62.77 ± 0.16 ^b
Fat	30.79 ± 0.03 ^b	15.21 ± 0.27 ^a	15.13 ± 0.37 ^a	15.99 ± 0.04 ^a	15.35 ± 0.44 ^a	15.54 ± 0.55 ^a	15.59 ± 0.45 ^a	15.72 ± 0.05 ^a
Protein	13.17 ± 0.11 ^a	13.31 ± 0.29 ^a	13.52 ± 0.33 ^a	13.06 ± 0.18 ^a	13.50 ± 0.26 ^a	14.22 ± 0.20 ^b	14.46 ± 0.17 ^b	14.29 ± 0.37 ^b
Ashes	3.21 ± 0.01 ^{bc}	3.26 ± 0.09 ^{bc}	3.20 ± 0.04 ^b	3.26 ± 0.03 ^{bc}	3.32 ± 0.02 ^c	3.19 ± 0.04 ^b	3.07 ± 0.03 ^a	3.26 ± 0.01 ^{bc}
<i>Energy content</i>								
Total calories ¹	345.5	203.4	201.2	208.8	209.5	211.8	214.9	218.3
From total fat	280.2 (81.1)	138.4 (68.04)	137.7 (68.44)	145.5 (69.68)	139.7 (66.68)	141.4 (66.76)	141.9 (66.03)	143.1 (65.55)
From meat source	280.2 (81.1)	138.4 (68.04)	78.4 (38.97)	82.9 (39.70)	79.5 (37.95)	19.6 (9.25)	19.6 (9.12)	19.8 (9.07)
From oils	–	–	59.3 (29.47)	62.7 (30.03)	60.1 (28.69)	121.8 (57.51)	122.2 (56.86)	123.3 (56.48)
From SFA	83.0 (24.0)	41.0 (20.2)	35.2 (17.5)	37.2 (17.8)	35.8 (17.1)	28.2 (13.3)	28.3 (13.2)	28.5 (13.1)
From MUFA	150.2 (43.5)	74.3 (36.5)	64.0 (31.8)	67.6 (32.4)	64.9 (31.0)	56.1 (26.5)	56.3 (26.2)	56.8 (26.0)
From PUFA	23.3 (6.7)	11.5 (5.7)	28.8 (14.3)	30.4 (14.6)	29.2 (13.9)	47.1 (22.2)	47.2 (22.0)	47.6 (21.8)

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$).

¹ Calculation based on 9.1 kcal/g for fat and 4.1 kcal/g for protein and carbohydrates. In brackets, percentage of energy content.

replaced (LFTO-K0, LFTO-K7, and LFTO-K15) by oil-in-water emulsion the fat is mostly vegetable and fish oils (with a lower and constant amount from meat and liver). In terms of ingredient composition and formulation (Table 1), around 43% and 86% of the fat contained by LFPO and LFTO respectively, were supplied by the oil-in-water emulsion. Depending on the pork backfat replacement level (partial or total), the pâtés contained 3–6 g, 2.5–5 g and 1.2–2.4 g (per 100 g of the product) of olive, linseed and fish oils respectively.

All samples had a protein content around 13% (Table 2), near target level. Since all samples were formulated with the same meat and liver content (Table 1), in the control pâtés the protein was mainly from both meat raw materials, with a small amount from pork backfat. In the modified low-fat pâté, on the other hand, because the pork backfat was partially or totally replaced by oil–water emulsion, the products contained not only meat proteins, but also SPI. This is why the samples where the pork backfat has been replaced completely by oil-in-water emulsion present higher ($P < 0.05$) protein contents than the rest of the formulations (Table 2).

The energy content of the normal fat control sample (NFC30) was 345 kcal/100 g (81% from fat) while in the low fat samples (around 40% lower than NFC30) it ranged from 201 to 218 kcal/100 g (Table 2), with fat accounting for over 65%. In samples with partial pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (LFPO samples), oil combinations accounted for nearly 30% of the total pâté energy content. In the case of total pork fat replacement (LFTO samples) these values were over 55% of the total pâté energy content. In these samples (LFTO) the approximate energy supplied by olive, linseed and fish oils was 53, 45 and 21 kcal/100 g, respectively.

3.2. Fatty acid profile

Since each group of pâtés—control samples (NFC30 and LFC15), low-fat samples formulated with partial pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (LFPO-K0, LFPO-K7 and LFPO-K15) and low-fat samples formulated with total pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (LFTO-K0, LFTO-K7 and LFTO-K15)—were formulated with the same lipid material, the data reported for fatty acid profiles (Table 3) are the mean values of these pâtés. Accordingly, the pâté formulation affected the fatty acid profile (Table 3).

The most abundant fatty acids in the control samples were MUFA (58%), followed by SFA and PUFA; MUFA and PUFA together accounting for 67% of the total fatty acids. These results are consistent with the presence of Iberian backfat in products (Estévez, Ventanas, Cava, & Puolanne, 2005b). Replacing the animal fat by the oil-in-water emulsion produced important changes in the fatty acid profile (Table 3) in line with the composition of the oil-in-water emulsion, which had a low proportion of SFA and a large quantity of MUFA and PUFA (Delgado-Pando et al., 2010b). Compared with the control

samples (32.23%), the products formulated with oil-in-water contained less ($P < 0.05$) SFA. Although SFA are considered to be the chief risk factor because of their hypercholesterolaemic effect, not all of them act in the same way. While stearic acid is neutral, palmitic and myristic acids produce the greatest atherogenic effect (Hu, Manson, & Willett, 2001). Palmitic acid is the main SFA in all the pâtés, but replacing the animal fat by the oil-in-water emulsion produces a decrease ($P < 0.05$).

Compared with the control samples, partial replacement of pork backfat produced pâté with lower ($P < 0.05$) MUFA and oleic acid contents. The lowest ($P < 0.05$) content of these fatty acids was found with total pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (Table 3). Even so, the total amount of oleic acid and MUFA in the reformulated pâtés, is similar to or even higher than that obtained in

Table 3
Fatty acid profile (as% of total fatty acids) and nutritional significant ratios of pâtés.¹

Fatty Acid	Control	LFPO	LFTO
Myristic C 14:0	1.09 ± 0.03 ^a	1.10 ± 0.03 ^a	1.13 ± 0.02 ^a
Palmitic C16:0	20.48 ± 0.11 ^c	17.01 ± 0.11 ^b	13.58 ± 0.17 ^a
Stearic C18:0	9.89 ± 0.02 ^c	8.49 ± 0.09 ^b	6.00 ± 0.42 ^a
Other SFA	0.77 ± 0.12 ^a	0.82 ± 0.21 ^a	0.63 ± 0.31 ^a
Σ SFA	32.23 ± 0.10 ^c	27.42 ± 0.27 ^b	21.34 ± 0.59 ^a
Palmitoleic C16:1	2.11 ± 0.01 ^b	1.97 ± 0.06 ^a	1.99 ± 0.02 ^a
Oleic C18:1n9	50.53 ± 0.19 ^c	43.44 ± 0.42 ^b	37.37 ± 0.19 ^a
Vaccenic C18:1n7c	3.86 ± 0.02 ^c	3.28 ± 0.08 ^b	2.82 ± 0.06 ^a
Eicosanoic C20:1n9c	1.39 ± 0.01 ^c	0.87 ± 0.03 ^b	0.30 ± 0.16 ^a
Other MUFAs	0.45 ± 0.15 ^a	0.21 ± 0.16 ^a	–
Σ MUFA	58.34 ± 0.11 ^c	49.77 ± 0.43 ^b	42.48 ± 0.12 ^a
Linoleic C18:2n6	7.38 ± 0.05 ^a	9.69 ± 0.09 ^b	11.64 ± 0.28 ^c
Linolenic C18:3n3	0.54 ± 0.00 ^a	8.58 ± 0.23 ^b	17.47 ± 0.34 ^c
Eicosadienoic C20:2n6c	0.50 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.15 ^a	–
Eicosatrienoic C20:3n3	0.62 ± 0.03 ^a	1.47 ± 0.03 ^b	1.57 ± 0.04 ^c
Eicosapentaenoic C20:5n3	–	1.22 ± 0.05 ^a	2.69 ± 0.07 ^b
Docosapentaenoic C22:5n3	–	0.24 ± 0.19 ^a	0.46 ± 0.01 ^b
Docosahexaenoic C22:6n3	–	1.00 ± 0.23 ^a	1.80 ± 0.03 ^b
Σ PUFA	9.04 ± 0.10 ^a	22.40 ± 0.43 ^b	35.64 ± 0.66 ^c
PUFA/SFA	0.28 ± 0.00 ^a	0.82 ± 0.02 ^b	1.67 ± 0.08 ^c
Σ n-3	1.16 ± 0.06 ^a	12.51 ± 0.30 ^b	24.00 ± 0.39 ^c
Σ n-6	7.87 ± 0.06 ^a	9.89 ± 0.14 ^b	11.64 ± 0.28 ^c
n-6/n-3	6.78 ± 0.33 ^c	0.79 ± 0.01 ^b	0.48 ± 0.00 ^a
Atherogenic index	0.37 ± 0.00 ^c	0.30 ± 0.00 ^b	0.23 ± 0.00 ^a
Thrombogenic index	0.86 ± 0.01 ^c	0.39 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.00 ^a

Means ± standard deviation. Different letters in the same row indicate significant differences ($P < 0.05$).

¹ Control, samples formulated with all pork fat (NFC30 and LFC15), LFPO, low-fat samples formulated with partial pork backfat replacement by oil (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil)-in-water emulsion (LFPO-K0, LFPO-K7 and LFPO-K15). LFTO low-fat samples formulated with total pork backfat replacement by oil (44.39% olive oil, 37.87% linseed oil and 17.74% fish oil)-in-water emulsion (LFTO-K0, LFTO-K7 and LFTO-K15). Since each type of samples (Control, LFPO and LFTO) were formulated with the same lipid material, data reported are the mean values of these pâtés.

meat product reformulations by various authors (D'Arrigo et al., 2004; Echarte, Conchillo, Ansorena, & Astiasaran, 2004; Martín et al., 2008). Diets rich in monounsaturated fat have been associated with positive health benefits (López-Miranda, Pérez-Martínez, & Pérez-Jiménez, 2006).

The incorporation of oil-in-water emulsions considerably increased ($P < 0.05$) PUFA proportions, due more to the reduction of SFA than of MUFA (Table 3). The replacement of SFA by PUFA is more effective in reducing serum cholesterol and the risk of coronary heart disease, than simply reducing total fat consumption (Hu et al., 2001). With total or partial pork backfat replacement, the PUFA content of pâtés (LFPO and LFTO) were 2.5 or 4 times higher respectively, as compared with control samples (Table 3). This increase is proportional to the substitution ($P < 0.05$) of the quantity of linoleic acid, linolenic and long-chain $n-3$ PUFA: EPA, docosapentaenoic (DPA) and DHA. The total $n-3$ PUFA values are 3.36 g/100 g for the LFTO pâtés, 1.75 g/100 g for the LFPO pâtés and 0.33 and 0.16 g/100 g for the two control pâtés (NFC30 and LFC15, respectively). This means that although dietary recommendations vary depending on different factors (population, desired disease prevention, etc.), these products can make a very important contribution to dietary intake as compared to non-fortified pâtés—considering that the dietary recommendation for total $n-3$ PUFA is estimated at between 1.4 and 3 g/day or even higher (EFSA, 2005; Garg, Wood, Singh, & Moughan, 2006; Kolanowski, Swiderski, & Berger, 1999). The long chain $n-3$ PUFA contents of the reformulated low-fat pâtés were 356 and 723 mg/100 g for LFPO and LFTO pâtés respectively, which means higher amounts than found in other $n-3$ enriched meat products (Jiménez-Colmenero, 2007). The importance of $n-3$ PUFA is that its consumption has been linked to reduced risk of cardiovascular disease, which in the case of the long chain $n-3$ PUFA may also imply a reduced risk of certain types of cancer, diabetes mellitus, inflammatory disease, multiple sclerosis and clinical depression (Garg et al., 2006; McAfee et al., 2010). In terms of the contribution of specific fatty acids to total product energy, and as compared with control samples (NFC30 and LFC15), the pork backfat replacement by oil-in-water emulsions caused a reduction of SFA and MUFA and an increased PUFA contribution (Table 2).

The recommended healthy PUFA/SFA ratio is above 0.4 (Wood et al., 2004). In the control pâtés, the ratio reached is 0.28 (Table 3), a similar value to those found by others in this type of product (Echarte et al., 2004; Martín et al., 2008). By replacing the pork fat, the PUFA/SFA ratio increases ($P < 0.05$), clearly exceeding the reference value (Table 3). There is a direct relationship between the replacement level of pork fat by a healthier lipid combination (of vegetable and marine origin) and an increase in the PUFA/SFA ratio. An increase in this ratio has been related to a reduction of total cholesterol in plasma (McAfee et al., 2010).

Although the $n-6$ PUFA (mainly linoleic acid) increase ($P < 0.05$) with the partial and total replacement of the animal fat, this occurs to a far lesser extent than with the $n-3$ PUFA (Table 3). This behaviour means a decrease ($P < 0.05$) in the $n-6/n-3$ ratio, by a factor of almost 9 in the LFPO products and more than 14 in the LFTO pâtés. These values (< 0.8) are lower than those obtained in liver pâté formulated using materials obtained from pigs fed on linseed oil-enriched diets (near 2) (D'Arrigo et al., 2004) and much lower than those normally found in this type of product (8–18) (D'Arrigo et al., 2004; Echarte et al., 2004; Estévez et al., 2005a). The $n-6/n-3$ PUFA ratio reduction is of nutritional importance because it has been linked to a reduced risk of various pathologies including diabetes, cancer, CVD. Accordingly, the recommended ratio is < 4 , but the optimal ratio may vary with the disease under consideration (Simopoulos, 2002). At present, the use of this ratio as a nutritional parameter is being reconsidered, as it may mean that the relative amounts of $n-3$ and $n-6$ PUFA are ignored, and it does not distinguish between the different fatty acids in each group (McAfee et al., 2010). For this reason, the UK Food Standards Agency has proposed the use of absolute amounts

of $n-3$ and $n-6$ PUFA, as well as of ALA and long chain $n-3$ PUFA, as nutritional parameters, instead of the $n-6/n-3$ ratio (Stanley et al., 2007).

Both the atherogenic index (AI) and the thrombogenic index (TI) are reduced ($P < 0.05$) with the partial and total replacement of the pork backfat by the oil-in-water emulsion (Table 3). The most noticeable effects of the reformulation on these indices can be seen in the TI, which decreases ($P < 0.05$) by half in the LFPO pâtés and is reduced ($P < 0.05$) by a factor of four in the LFTO pâtés.

Similar results have been reported in the fatty acid profiles and nutritional significant ratios of frankfurters when the same reformulation strategy was applied (Delgado-Pando et al., 2010a).

3.3. Emulsion stability

Emulsion stability is affected ($P < 0.05$) by formulation (Table 4). Both the normal fat control sample (NFC30), and the low fat pâtés in which all the pork backfat had been replaced by oil-in-water emulsion (LFTO-K0, LFTO-K7 and LFTO-K15) generally had lower ($P < 0.05$) cooking losses (TFR). The LFC15 and LFPO-K0 samples present lower water and fat binding properties, with TFR values above 10%. Independently of the product formulation, the cooking losses were mainly due to water loss (80–90% of the total fluid released) (Table 4).

Comparing control samples it can be seen that the higher the fat content, the higher the emulsion stability (Table 4). This behaviour is coherent with the fat being reduced by added water (Table 1) (Claus, Hunt, & Kastner, 1989; Jiménez-Colmenero, Barreto, Mota, & Carballo, 1995). When the fat reduction is accompanied by an increase in the proportion of moisture while protein levels remain the same (Table 2), there is a lower “effective” concentration of protein acting to form the gel/emulsion matrix, reducing the water binding properties of samples with lower fat content (Table 4).

In the low fat samples, the amount of added water in each formulation, (decreasing as pork backfat replacement increased) can also affect the characteristics of the matrix formed as previously reported. This may explain why the highest proportion of added water (LFC15 and LFPO-K0) (Table 1) produced the lowest water and fat binding properties (Table 4). Although it has been pointed out that a higher unsaturated fatty acid content (with a lower melting point than saturated fats) may reduce emulsion stability (Martín et al., 2008), this effect does not seem to influence this experiment. In the products with added konjac (with lower added water), part of the water present in the product was embedded and bound in the konjac gel and hence was not available for formation of the protein matrix. In these conditions no clear effect was observed of this component on the water binding properties. Improving emulsion stability of low-fat pork meat batters with added konjac gel has been reported (Fernández-Martín, López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009).

Table 4
Emulsion stability (Total fluid release-TFR, water loss-WL and fat loss-FL) of pâtés.¹

Sample	Emulsion stability		
	TFR(%)	WL (%)	FL (%)
NFC30	1.78 ± 0.17 ^a	1.48 ± 0.21 ^a	0.30 ± 0.05 ^{ab}
LFC15	11.94 ± 0.50 ^e	10.68 ± 0.45 ^e	1.25 ± 0.05 ^f
LFPO-K0	10.51 ± 0.23 ^d	9.49 ± 0.35 ^d	1.09 ± 0.02 ^e
LFPO-K7	4.76 ± 0.40 ^c	4.33 ± 0.45 ^c	0.43 ± 0.06 ^{cd}
LFPO-K15	4.53 ± 0.14 ^c	4.04 ± 0.13 ^c	0.49 ± 0.02 ^d
LFTO-K0	3.28 ± 0.59 ^b	2.92 ± 0.53 ^b	0.35 ± 0.06 ^{bc}
LFTO-K7	2.13 ± 0.48 ^{ab}	1.92 ± 0.43 ^{ab}	0.21 ± 0.05 ^a
LFTO-K15	2.37 ± 0.16 ^b	2.15 ± 0.18 ^{ab}	0.22 ± 0.04 ^{ab}

¹ For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

3.4. Colour and pH

Colour parameters were affected by the pâté formulation (Table 5). Comparing the two control samples, it can be seen that reduction of fat generates decreased ($P<0.05$) lightness and yellowness values, and increased ($P<0.05$) redness. A reduction of fat levels (and increased added water) generally favours the appearance of darker colouring (higher redness and lower lightness) (Carballo, Mota, Barreto, & Jiménez-Colmenero, 1995). With no difference between the substitution levels, both partial and total backfat replacement by oil-in-water emulsion (LFC15 v. LFPO and LFTO) generally produced an increase in L^* and b^* . In parallel there was a decrease ($P<0.05$) of a^* , which became more marked as the level of substitution increased (Table 5).

The effect of the presence of konjac varies depending on the formulation (Table 5). Thus, in the formulations with partial replacement of the pork backfat small changes in the colour parameter were observed. In contrast, in LFTO pâtés, the addition of konjac produced less red ($P<0.05$), paler ($P<0.05$) and yellower pâtés. It has generally been reported that the addition of konjac gel to comminuted meat products has little effect on colour (Kao & Lin, 2006; Lin & Huang, 2003).

Although there are significant variations in pH from the effect of the formulation they are of little quantitative relevance (Table 5). The values obtained (6.54–6.57) are similar to those described for this type of product (Estévez et al., 2005a; Fernández-López et al., 2004; Hong et al., 2004). As a result, formulation has very little influence on the pH of the pâtés.

3.5. Penetration test

Texture parameters were affected by the pâté formulation (Table 6). Comparing the two control samples, shows that the fat reduction produced a decrease ($P<0.05$) of slope, penetration force and gel strength, which means a softer and more spreadable pâté. This behaviour in pâté (Viana et al., 2005) and other gel/emulsion systems (Carballo et al., 1996a; Cofrades, Carballo, & Jimenez-Colmenero, 1997; Crehan, Hughes, Troy, & Buckley, 2000; Gregg, Claus, Hackney, & Marriott, 1993, among others), is coherent with the fat and water binding properties (Table 4) and with the effect of reducing fat on the texture of meat based emulsion products providing the meat protein content is kept constant, as previously reported. However, others have observed that fat reduction causes increased hardness of liver pâté (Estévez et al., 2005) and frankfurters (Ayo, Carballo, Solas, & Jimenez-Colmenero, 2008; Hughes, Mullen, & Troy, 1998), or has no effect on the textural parameters (Llurueña-Martínez, Vivar-Quintana, & Revilla, 2004; Ordóñez, Rovira, & Jaime, 2001).

As compared with the low fat control samples (LFC15), no effect ($P>0.05$) was observed on textural parameters by the partial (LFPO-K0) or total (LFTO-K0) replacement of the backfat by oil-in-water emulsion. Various factors may contribute to the effect on the texture of meat products of substituting vegetable oils for animal fat. On the

Table 6
Penetration test parameters for pâtés.¹

Sample	Slope (N/mm)	Penetration force (N)	Gel Strength (mJ)
NFC30	0.72 ± 0.07 ^d	2.36 ± 0.10 ^d	4.95 ± 0.97 ^c
LFC15	0.49 ± 0.07 ^{ab}	1.66 ± 0.10 ^{ab}	3.46 ± 0.69 ^{ab}
LFPO-K0	0.46 ± 0.05 ^a	1.49 ± 0.13 ^a	2.92 ± 0.58 ^{ab}
LFPO-K7	0.53 ± 0.07 ^{abc}	1.50 ± 0.19 ^a	2.47 ± 0.48 ^a
LFPO-K15	0.58 ± 0.09 ^{abc}	1.97 ± 0.19 ^c	3.92 ± 0.37 ^{bc}
LFTO-K0	0.61 ± 0.07 ^{bcd}	1.64 ± 0.09 ^{ab}	2.62 ± 0.57 ^a
LFTO-K7	0.64 ± 0.06 ^{cd}	1.83 ± 0.12 ^{bc}	3.08 ± 0.42 ^{ab}
LFTO-K15	0.64 ± 0.04 ^{cd}	2.25 ± 0.11 ^d	4.93 ± 0.73 ^c

¹ For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

one hand there are those related with the fat source characteristics, including the intact adipocytic structure of pork backfat, or the higher unsaturated levels of oils (Martín et al., 2008) and their better distribution (as compared with animal fat) in the protein matrix (Hammer, 1991, as cited by Hong et al., 2004). On the other hand, the composition factors of the meat matrix (changes in moisture and protein contents), to which a great deal of importance has been attached (Carballo, Fernández, Barreto, Solas, & Jiménez-Colmenero, 1996b; Claus et al., 1989), may also help to explain the apparent discrepancies regarding the effect of substituting oil for animal fat.

Compared with low fat pâtés with 0 and 7% of added konjac gel, the addition of 15% of konjac gel (LFPO-K15 and LFTO-K-15) produced harder structures (Table 6), which are very close to those of the control samples (NFC30 and LFC15), especially in NFC30 and LFTO-K-15 with similar ($P>0.05$) textural parameters (Table 6). Although the effect of replacing pork backfat with konjac gels varies according to the nature of the gel and the proportion of fat replaced (Jiménez-Colmenero et al., 2010), similar effects to those described in this experiment have been reported (Chin, Keeton, Longnecker, & Lamkey, 1999; Chin et al., 2000).

3.6. Microbiology

The raw meat batters had microbial populations between 5.8–6.5 log cfu/g for TVC and 3.7–4.9 for Enterobacteriaceae (Table 7). The heat treatment resulted in a marked decrease in the microbial population, reaching values less than 3.3 log/g for TVC and <2 for Enterobacteriaceae in the different pâtés. In these products, although there were significant differences, the variation between the formulations was of little importance. The total aerobic counts are similar to, or even lower than those recorded by others in this kind of product (Beldarraín, De la Mella, Yáñez, García, & Cepero, 2003; Soffer, Margalith, & Mannheim, 1994) and in comminuted meat products

Table 5
Colour parameters (lightness- L^* , redness- a^* and yellowness- b^*) and pH of pâtés.¹

Sample	L^*	a^*	b^*	pH
NFC30	62.38 ± 0.50 ^c	11.89 ± 0.14 ^d	12.27 ± 0.36 ^b	6.55 ± 0.01 ^{ab}
LFC15	59.67 ± 0.49 ^a	13.97 ± 0.28 ^f	11.59 ± 0.44 ^a	6.56 ± 0.00 ^{bc}
LFPO-K0	60.89 ± 0.51 ^b	12.15 ± 0.21 ^d	13.76 ± 0.19 ^d	6.55 ± 0.01 ^{ab}
LFPO-K7	62.76 ± 0.55 ^c	11.24 ± 0.26 ^c	14.09 ± 0.18 ^{de}	6.54 ± 0.01 ^a
LFPO-K15	59.77 ± 0.49 ^a	12.98 ± 0.19 ^e	13.18 ± 0.19 ^c	6.54 ± 0.01 ^a
LFTO-K0	60.78 ± 0.52 ^b	12.78 ± 0.19 ^e	13.69 ± 0.23 ^d	6.57 ± 0.01 ^c
LFTO-K7	64.09 ± 0.15 ^d	10.50 ± 0.24 ^b	14.26 ± 0.14 ^c	6.54 ± 0.01 ^a
LFTO-K15	64.68 ± 0.30 ^d	10.08 ± 0.16 ^a	14.15 ± 0.18 ^{de}	6.54 ± 0.01 ^a

¹ For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

Table 7
Microbiological analysis of raw batters and pâtés (log cfu/g).¹

Samples	Total viable count		Enterobacteriaceae	
	Raw batter	Pâté	Raw batter	Pâté
NFC30	5.76 ^a	2.78 ^{ab}	3.75 ^a	<1
LFC15	6.53 ^c	3.28 ^b	4.06 ^{bc}	<2
LFPO-K0	5.85 ^{ab}	2.56 ^{ab}	4.18 ^c	<1
LFPO-K7	5.89 ^{ab}	2.42 ^{ab}	4.78 ^d	<2
LFPO-K15	5.92 ^{ab}	3.00 ^b	3.91 ^{ab}	<2
LFTO-K0	6.37 ^{bc}	2.54 ^{ab}	4.10 ^c	<2
LFTO-K7	6.32 ^{bc}	2.67 ^{ab}	3.92 ^b	<2
LFTO-K15	6.37 ^{bc}	<2 ^a	4.97 ^e	<2

¹ For sample denomination see Table 1. Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

(Kao & Lin, 2006; López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009).

3.7. Sensory evaluation

Table 8 shows the sensory evaluation of the pâtés, which was affected by product composition. In the control samples fat reduction increased ($P < 0.05$) colour, without any significant changes in other sensory parameters. In terms of objective colour parameters (Table 5), fat reduction produced darker products (Table 8). Both the replacement of animal fat by the oil-in-water emulsion and the addition of konjac affected the colour of the pâtés. Those with the lowest colour scores ($P < 0.05$) were the NFC30, LFPO-K0, LFPO-K7, LFTO-K7 and LFTO-K15 samples. (Table 8). Fat perception was not clearly affected by fat content (type and levels), however in general, as the added konjac increased fat perception tended to decrease. In terms of texture, samples LFPO-K0, LFPO-K15 and LFTO-K15 scored lowest. The rest of the formulations scored above average values on the scale, with no significant differences between them ($P > 0.05$). All samples had similar ($P > 0.05$) flavour and overall acceptability scores, although LFPO-K15 and LFTO-K15 scored lowest, the only scores below the average scale values.

4. Conclusion

Based on recommendations for optimal intake of total and unsaturated fatty acids, modifying lipid fractions in meat products has been concerned chiefly with reducing fat content and improving fatty acid profiles. This proposal is more interesting and presents greater technological difficulty in products with high fat and energy contents such as pâté. Reformulation strategies, based on the use of a specifically designed combination of vegetable and fish oils and konjac gel as pork fat replacements, enabled the production of low fat pâtés with a healthier lipid profile. Compared with normal fat pâté, the modified products have lower fat (50%) and SFA (33%) contents, as well as a higher proportion (4 times more) of n-3 PUFA (ranging between 1.75 and 3.36 g/100 g), including a relevant amount of long chain n-3 PUFA (356 and 723 mg/100 g). This would be a very important contribution to dietary intake, generally higher than reported in different n-3 enriched meat products, without compromising the technological, microbiological and sensorial properties of the pâtés. Work is in progress to study the storage stability of these products.

Acknowledgements

This research was supported by projects AGL2007-61038/ALI and AGL2008-04892-CO3-01 and the Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016), Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Table 8
Sensory analysis of pâtés.¹

Sample	Flavour	Texture	Colour	Fatness	Overall acceptability
NFC30	6.4 ± 1.1 ^a	6.6 ± 1.6 ^b	3.1 ± 1.3 ^a	5.9 ± 1.9 ^{bc}	6.2 ± 1.6 ^a
LFC15	5.3 ± 2.2 ^a	5.3 ± 2.0 ^{ab}	5.6 ± 0.9 ^{bc}	6.8 ± 1.0 ^c	5.5 ± 2.3 ^a
LFPO-K0	5.8 ± 2.8 ^a	4.3 ± 2.0 ^a	4.4 ± 1.4 ^{ab}	6.0 ± 1.7 ^{bc}	5.0 ± 2.5 ^a
LFPO-K7	5.3 ± 2.4 ^a	6.0 ± 1.9 ^{ab}	3.8 ± 1.7 ^a	6.2 ± 1.8 ^{bc}	6.2 ± 2.6 ^a
LFPO-K15	4.2 ± 1.3 ^a	4.4 ± 1.5 ^a	6.5 ± 1.2 ^c	4.6 ± 1.7 ^{ab}	4.3 ± 1.9 ^a
LFTO-K0	5.1 ± 1.6 ^a	6.0 ± 1.9 ^{ab}	6.2 ± 1.1 ^c	5.7 ± 1.7 ^{bc}	5.7 ± 1.7 ^a
LFTO-K7	6.0 ± 1.6 ^a	5.2 ± 1.9 ^{ab}	4.0 ± 0.8 ^a	4.7 ± 1.7 ^{ab}	5.6 ± 1.7 ^a
LFTO-K15	4.2 ± 2.2 ^a	4.2 ± 2.3 ^a	3.4 ± 1.2 ^a	3.6 ± 1.3 ^a	4.5 ± 2.4 ^a

¹ For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

References

- AOAC (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (17th edition). Maryland (USA): Association of Official Analytical Chemistry.
- Ayo, J., Carballo, J., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Physicochemical and sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content. *Food Chemistry*, 107, 1547–1552.
- Beldarraín, T., De la Mella, R. M., Yáñez, J., García, A., & Cepero, Y. (2003). Durabilidad de pastas untantes con sabor jamón, hígado y chorizo. *Alimentaria*, 347, 87–90.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Carballo, J., Fernandez, P., Barreto, G., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996a). Characteristics of high- and low-fat bologna sausages as affected by final internal cooking temperature and chilling storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 40–48.
- Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996b). Morphology and texture of bologna sausage containing different levels of fat, starch and egg white. *Journal of Food Science*, 61, 652–655.
- Carballo, J., Mota, N., Barreto, G., & Jiménez-Colmenero, F. (1995). Binding-properties and color of bologna sausage made with varying fat levels, protein-levels and cooking temperatures. *Meat Science*, 41, 301–313.
- Chin, K. B., Keeton, J. T., Longnecker, M. T., & Lamkey, J. W. (1999). Utilization of soy protein isolate and konjac blends in a low-fat bologna (model system). *Meat Science*, 53, 45–57.
- Chin, K. B., Keeton, J. T., Miller, R. K., Longnecker, M. T., & Lamkey, J. W. (2000). Evaluation of konjac blends and soy protein isolate as fat replacements in low-fat bologna. *Journal of Food Science*, 65, 756–763.
- Claus, J. R., Hunt, M. C., & Kastner, C. L. (1989). Effects of substituting added water for fat on the textural, sensory, and processing characteristics of bologna. *Journal of Muscle Foods*, 1, 1–21.
- Cofrades, S., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (1997). Heating rate effects on high-fat and low-fat frankfurters with a high content of added water. *Meat Science*, 47, 105–114.
- Crehan, C. M., Hughes, E., Troy, D. J., & Buckley, D. J. (2000). Effects of fat level and maltodextrin on the functional properties of frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat Science*, 55, 463–469.
- D'Arrigo, M., Hoz, L., Cambero, I., López-Bote, C. J., Pin, C., & Ordóñez, J. A. (2004). Production of n-3 fatty acid enriched, pork liver pâté. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 37, 585–591.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2010a). Healthier lipid combination as functional ingredient in sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 859–870.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2010b). Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems. An approach for the development of functional meat products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 791–801.
- Echarte, M., Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish pâtés. *Food Chemistry*, 86, 47–53.
- EFSA (2005). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat. *The EFSA Journal*, 253, 1–29.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005a). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92, 449–457.
- Estévez, M., Ventanas, J., Cava, R., & Puolanne, E. (2005b). Characterisation of a traditional Finnish liver sausage and different types of Spanish liver pâtés: A comparative study. *Meat Science*, 71, 657–669.
- Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2004). Quality characteristics of ostrich liver pâté. *Journal of Food Science*, 69, S85–S91.
- Fernández-Martin, F., López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association. *Meat Science*, 83, 209–217.
- García-Iníguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M. I., Caverio, R. Y., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2010). Selenium, iodine, omega-3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: A combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science*, 85, 274–279.
- Garg, M. L., Wood, L. G., Singh, H., & Moughan, P. J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71, R66–R71.
- Gregg, L. L., Claus, J. R., Hackney, C. R., & Marriott, N. G. (1993). Low-fat, high added water bologna from massaged, minced batter. *Journal of Food Science*, 58, 258–264.
- Hong, G., Lee, S., & Min, S. (2004). Effects of replacement pork backfat with soybean oil on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology*, 13, 51–56.
- Hu, F. B., Manson, J. E., & Willett, W. C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, 20, 5–19.
- Hughes, E., Mullen, A. M., & Troy, D. J. (1998). Effects of fat level, tapioca starch and whey protein on frankfurters formulated with 5% and 12% fat. *Meat Science*, 48, 169–180.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 567–578.
- Jiménez-Colmenero, F., Barreto, G., Mota, N., & Carballo, J. (1995). Influence of protein and fat content and cooking temperature on texture and sensory evaluation of bologna sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 28, 481–487.

- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., & Solas, M. T. (2010). Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Science*, 84, 356–363.
- Kaack, K., & Pedersen, L. (2005). Low-energy and high-fibre liver pâté processed using potato pulp. *European Food Research and Technology*, 220, 278–282.
- Kao, W. T., & Lin, K. W. (2006). Quality of reduced-fat frankfurter modified by konjac-starch mixed gels. *Journal of Food Science*, 71, S326–S332.
- Kolanowski, W., Swiderski, F., & Berger, S. (1999). Possibilities of fish oil application for food products enrichment with ω -3 PUFA. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 39–49.
- Lin, K. W., & Huang, H. Y. (2003). Konjac/gellan gum mixed gels improve the quality of reduced-fat frankfurters. *Meat Science*, 65, 749–755.
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83, 148–154.
- López-López, I., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Science*, 83, 255–262.
- López-Miranda, J., Pérez-Martínez, P., & Pérez-Jiménez, F. (2006). Health benefits of monounsaturated fatty acids. In C. Williams, & J. Buttriss (Eds.), *Improving the Fat Content of Foods* (pp. 71–106). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Lurueña-Martínez, M. A., Vivar-Quintana, A. M., & Revilla, I. (2004). Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat Science*, 68, 383–389.
- Martín, D., Antequera, T., Muriel, E., Pérez-Palacios, T., & Ruiz, J. (2009). Liver pâté from pigs fed conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology*, 228, 749–758.
- Martín, D., Ruiz, J., Kivikari, R., & Puolanne, E. (2008). Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver pâtés: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. *Meat Science*, 80, 496–504.
- McAfee, A. J., McSorley, E. M., Cuskelly, G. J., Moss, B. W., Wallace, J. M. W., Bonham, M. P., & Fearon, A. M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*, 84, 1–13.
- Ordóñez, M., Rovira, J., & Jaime, I. (2001). The relationship between the composition and texture of conventional and low-fat frankfurters. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 749–758.
- Paneras, E. D., Bloukas, J. G., & Filis, D. G. (1998). Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *Journal of Muscle Foods*, 9, 111–126.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 365–379.
- Soffer, T., Margalith, P., & Mannheim, C. H. (1994). Shelf-life of chicken liver egg pâté in modified atmosphere packages. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 161–166.
- Stanley, J. C., El Som, R. L., Calder, P. C., Griffin, B. A., Harris, W. S., Jebb, S. A., Lovegrove, J. A., Moore, C. S., Riemersma, R. A., & Sanders, T. A. B. (2007). UK Food Standards Agency Workshop Report: The effects of the dietary n-6: n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*, 98, 1305–1310.
- Ulbricht, T. L. V., & Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart-disease—7 dietary factors. *Lancet*, 338(8773), 985–992.
- Viana, F. R., Silva, V. D. M., Delvivo, F. M., Bizzotto, C. S., & Silvestre, M. P. C. (2005). Quality of ham pâté containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, 70, 153–160.
- WHO (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of chronic diseases. In WHO (Ed.), *Technical Report Series*. Geneva (Switzerland).
- Wood, J. D., Richardson, R. L., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R., & Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Science*, 66, 21–32.

***IV.1.5. Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel:
Dynamic rheological properties and technological behaviour during chill
storage***

Meat Science, 2012, 92, 44-52



Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel: Dynamic rheological properties and technological behaviour during chill storage

G. Delgado-Pando, S. Cofrades, C. Ruiz-Capillas, M. Triki, F. Jiménez-Colmenero *

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, (Formerly Instituto del Frío) (CSIC), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2012

Received in revised form 16 March 2012

Accepted 1 April 2012

Keywords:

Pâté
Healthier oil combination
Konjac gel
Rheological properties
Texture
Chilling storage

ABSTRACT

Low-fat pork liver pâtés enriched with n-3 PUFA/konjac gel were formulated by replacing (total or partially) pork backfat by a combination of healthier oils (olive, linseed and fish oils) and konjac gel. Dynamic rheological properties and technological behaviour of pâtés during chill storage (2 °C, 85 days) were analysed. Cooking yields were affected ($P < 0.05$) by formulation, with percentages ranging between 88 and 98%. According to the frequency sweep test, pâtés presented a gel/emulsion-like pattern with a loosely-structured network and the consistency of a viscoelastic gel. Thermal processing caused the formation of a protein gel network with a considerable element of emulsion-like characteristics. Pâtés became lighter and less red ($P < 0.05$) during chill storage. Purge losses of around 1% were observed at the end of the storage period, irrespective of formulation. Textural parameters of pâtés were affected by formulation and storage time. The results suggest that the replacement of pork back fat by oil-in-water emulsion and the incorporation of konjac gel could provide a mixture of ingredients that effectively mimics the normal animal fat content in pâtés.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several processing strategies have been developed for the production of potential meat-based functional foods, particularly those aimed at improving fat content in order to promote better dietary fat intakes. Reducing the fat content and/or replacing the animal fat present in meat products are strategies commonly used to obtain products more in line with health recommendations: i.e. containing smaller proportions of saturated fatty acids (SFA) and larger proportions of monounsaturated (MUFA) or polyunsaturated (PUFA) fatty acids, especially long chain n-3 PUFA, better n-6/n-3 PUFA and PUFA/SFA ratios, and if possible cholesterol-free (Jiménez-Colmenero, 2007). Pâtés are a popular cooked meat product which raises some health concerns due to their high animal fat (around 30%) and energy contents (around 350 kcal/100 g). Pâté reformulation processes have been used to achieve better lipid compositions by reducing the fat content (Estévez, Ventanas, & Cava, 2005; Kaack & Pedersen, 2005; Viana, Silva, Delvivo, Bizzotto, & Silvestre, 2005) and/or improving the fatty acid profile (D'Arrigo et al., 2004; Hong, Lee, & Min, 2004a; Martín, Antequera, Muriel, Pérez-Palacios, & Ruiz, 2009; Martín, Ruiz, Kivikari, & Puolanne, 2008). The incorporation of individual lipids (of plant or marine origin) to meat products does improve their fatty acid profile, but a better approximation to an optimal lipid profile from a health standpoint can be achieved using healthier oil combinations as animal

fat replacers (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Solas, & Jiménez-Colmenero, 2010; García-Iníguez de Ciriano et al., 2010; López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009; Paneras, Bloukas, & Filis, 1998). Because these lipid materials are added as fat ingredients, their physico-chemical characteristics can affect their role in the meat system and hence the properties of the reformulated product (Delgado-Pando et al., 2010).

In a previous paper (Delgado-Pando, Cofrades, Rodríguez-Salas, & Jiménez-Colmenero, 2011) the suitability of a healthier pâté reformulated by reducing and replacing the animal fat content with a healthier (marine and plant origin) oil-in-water emulsion and konjac gel was assessed. The healthier lipid combination was a mixture of olive, linseed and fish oils in proportions to achieve healthier (better fatty acid profile) intake goals. Compared with normal fat pâté, the modified products had lower fat (50%) and SFA (33%) contents, as well as a higher proportion (4 times more) of n-3 PUFA (ranging between 1.75 and 3.36 g/100 g), including a significant amount of long chain n-3 PUFA (356 and 723 mg/100 g). This constitutes a very important contribution to dietary intake, generally higher than in other n-3 enriched meat products (Jiménez-Colmenero, 2007), without compromising the technological, microbiological and sensory properties of the reformulated pâtés. A further interesting feature of the new pâté formulation was the use of konjac as a fat substitute (an application not hitherto tried in pâté-type products); this ingredient possesses important technological properties (water retention, gelling and thickening) and potential health implications (e.g. reducing cholesterol, insulin and glucose levels or satiating and laxative effects) (Tye, 1991; Zhang et al., 2001). The results regarding the nutritional, technological and sensory properties

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.
E-mail address: fjimenez@ictan.csic.es (F. Jiménez-Colmenero).

showed that it is possible to produce such healthier pâtés. However, further analyses are needed to find out more about the properties of these reformulated meat systems; a fuller understanding of the matrix characteristics (such as dynamic rheological properties) will help to understand the protein matrix structure and improve the quality of reformulated meat-based food systems. At the same time, the behaviour of the pâté in chill storage needs to be considered to gain a more accurate assessment of the suitability of this strategy for the healthier reformulation of pâtés.

The aim of the additional studies described in this paper is two-fold: on the one hand to analyse the rheological properties of the meat matrix, and on the other hand to assess the technological behaviour during chill storage of these healthier lipid pâtés, reformulated to produce better lipid compositions by reducing fat content and/or replacing pork backfat by an oil (healthier lipid combination)-in-water emulsion and konjac gel. As established elsewhere (Delgado-Pando et al., 2011), these formulations possess suitable nutritional, technological and sensory characteristics. Proximate analysis, cooking yield and dynamic rheological properties were analysed to provide information about the composition and structure of the pâtés. Changes in technological properties (purge loss, colour, pH and texture) were also studied during chill storage (85 days at 2 °C) to find out how the composition of the pâté can affect its storage stability. As far the authors are aware there is no literature relating to the research reported in this paper, involving pâtés reformulated with simultaneous tests in which the fat content was reduced and the animal fat replaced with ones more compatible with health recommendations. Studies on lipid oxidation, microbiology, residual nitrite and biogenic amine formation in these products will be reported later.

2. Materials and methods

2.1. Materials, healthy pâté preparation and chilled storage

The raw materials and procedures used for the manufacture of oil-in-water emulsions and konjac gel were as reported by Delgado-Pando et al. (2011). Briefly, fresh post-rigor pork meat (mixture of *M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. gracilis* and *M. adductor*), Iberian pork backfat and pork liver were obtained from a local market. The oil-in-water emulsion (O/SPI) was prepared with 2.26% soy protein isolate (Vicoprot, TRADES S.A., Barcelona, Spain), 42.11% water and a 52.63% oil combination containing 44.39% olive oil (Carbonell Virgen Extra, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain), 37.87% linseed oil (Natursoy S.L., Alimentos Ecológicos, Castellterçol, Spain) and 17.74% fish oil (Omevital 18/12 TG Gold, Cognis GMBH, Illertissen, Germany). The konjac gel (KG) was prepared with 81% water, 5% konjac flour (glucomannan 83%, 120 mesh, Trades S.A., Barcelona, Spain), 3% pre-gelled corn starch (Amigel, Julio Criado S. L. Madrid, Spain), 1% i-carrageenan

(Secolata IP. Hispanagar, Burgos, Spain) and 10% Ca(OH)₂ solution (1%) (Panreac Química S. A. Barcelona, Spain).

Six different formulations were studied (Table 1). Two control samples (all pork fat) were prepared, one with normal (30%) fat content (NFC30) similar to the commercial product and another with low (15%) fat content (LFC15). Two low fat (15%) samples were also formulated with partial substitution of pork backfat by the oil-in-water emulsion, one without (LFPO-K0) and one with added (7.5%) konjac gel (LFPO-K7). Finally, two further low fat (15%) samples were formulated with total substitution of pork backfat by the oil-in-water emulsion, one without (LFTO-K0) and one with added (7.5%) konjac gel (LFTO-K7). Of the formulations previously studied (Delgado-Pando et al., 2011), these were the ones that presented the best nutritional, technological and sensory characteristics. The specific conditions for the elaboration of these pâtés have been detailed in Delgado-Pando et al. (2011). After production, raw pâté batters (50 ± 2 g), were placed in plastic containers (length 11.5 cm, diameter 2.7 cm) and heated to 80 °C (Delgado-Pando et al., 2011). When processing was complete, the pâtés were cooled in a water bath (5–10 °C) and stored at 2 ± 2 °C for 85 days, during which they were analysed periodically.

2.2. Cooking yield

Cooking yield was determined as drip losses occurring during pâté cooking. Containers of each batter were weighed before cooking, cooked, tempered (20 min at room temperature), drained and weighed again. Cooking yield (as percentage) was determined in triplicate from the differences in weight.

2.3. Proximate analysis

Moisture and ash contents of the pâtés were determined (AOAC, 2000) in triplicate and in duplicate respectively. Fat content was evaluated (in triplicate) according to Bligh and Dyer (1959). Protein content was measured in quadruplicate by a LECO FP-2000 Nitrogen Determinator (Leco Corporation, St Joseph, MI).

2.4. Dynamic rheological properties

Dynamic rheological experiments were conducted using a Bohlin CVO-100 controlled-stress rheometer (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK). The measurement system was a PP20 (20 mm diameter) circular plate geometry with a 1 mm gap in all samples. A thin film of Vaseline oil (Codex purissimum, Panreac Química S. A. Barcelona, Spain) was gently applied to the edge of each exposed sample to prevent moisture loss. Samples were allowed to relax for 5 min before conducting rheological measurements, equilibration time after loading the sample on the sensor system. Temperature

Table 1
Formulation and target composition of raw batters.

Sample ^a	Formulation (%)						Target composition (%) ^b		
	Meat	Pork liver	Pork backfat	O/SPI	Konjac gel	Water	Moisture	Protein	Fat
NFC30	19.2	33.0	31.5	0.0	0.0	10.5	50.9	13.8	30.3
LFC15	19.2	33.0	14.6	0.0	0.0	27.4	66.5	13.2	15.3
LFPO-K0	19.2	33.0	7.3	12.3	0.0	22.4	66.0	13.6	15.3
LFPO-K7	19.2	33.0	7.3	12.3	7.5	14.9	65.3	13.6	15.3
LFTO-K0	19.2	33.0	0.0	24.6	0.0	17.4	65.5	14.0	15.3
LFTO-K7	19.2	33.0	0.0	24.6	7.5	9.9	65.3	14.0	15.3

^a NFC30: normal fat (30%) control pâté, sample formulated with pork backfat; LFC15: low fat (15%) control pâté, sample formulated with pork backfat; LFPO: low fat (15%) pâté formulated with partial pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); LFTO: low fat (15%) pâté formulated with total pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); in each case K0 and K7 indicate the addition of 0% and 7.5% of konjac gel respectively.

^b Estimated from formulation and composition data of the ingredients.

control was with a Peltier Plate system (-40 to $+180$ °C; Bohlin Instruments, Gloucestershire, UK). The linear viscoelastic region was determined for each sample through stress sweeps at 0.16 Hz. After that, a dynamic frequency sweep was conducted by applying a constant pre-determined stress within the linear region, over a frequency range between 0.1 and 10 Hz for each sample. The measurements were made at 25 °C. A temperature sweep was conducted from 10 °C to 90 °C at a rate of 1 °C/min using a frequency of 0.1 Hz and a constant strain of 0.5%. Parameters including complex modulus (G^* Pa), storage modulus (G' Pa), loss modulus (G'' Pa), and the phase angle (δ°) were derived using the analysis programme software. Results reported were averages of at least three measurements.

2.5. Chill storage properties

2.5.1. Purge loss

Water and fat binding properties of pâté during chill storage were evaluated (in quadruplicate) as purge loss (PL). In each control (except for 0 days) the pâtés were tempered for 20 min and then removed from their containers, the exudates drained and the pâté surface gently dried with paper towels, then they were weighed again. The PL was expressed as percentage of the initial weight.

2.5.2. Instrumental colour measurement

Colour, CIE-LAB tristimulus values, lightness, L^* ; redness, a^* and yellowness, b^* of pâté cross-sections were immediately evaluated on a CR-400 Chroma Meter (Konica Minolta Business Technologies, Inc., Tokyo, Japan). Six determinations were performed for each formulation and storage time.

2.5.3. pH determination

The pH was determined on an 827 Metrohm pH-meter (Metrohm AG, Switzerland) at room temperature on homogenates of pâtés in water in a ratio of 1:10 (w/v). Six determinations were performed for each sample and storage time.

2.5.4. Penetration test

Texture analysis was based on a penetration test (Carballo, Fernández, & Jiménez Colmenero, 1996) performed on samples in plastic containers at room temperature (22 °C). The test was performed using a 6 mm diameter cylindrical stainless steel plunger attached to a 5 kg cell connected to the crosshead of TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY). The corresponding force-penetration curves (at 0.8 mm/s crosshead speed) were plotted and analysed. The rheological parameters of each sample derived from these curves were: distance at the point of gel rupture (mm); slope (S) of the force-deformation curve (N/mm); penetration force (PF); the force exerted at the point of gel rupture (N); and gel strength (N/mm), which is defined as the area enclosed by the force-deformation curve. Determinations were carried out six times in each case.

2.6. Statistical analysis

The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples. Data were analysed using IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) for Pearson correlations and one-way and two-way ANOVA. Least squares differences were used for comparison of mean values among treatments and Tukey's HSD test to identify significant differences ($P < 0.05$) between formulations and storage times.

Cooking Yield

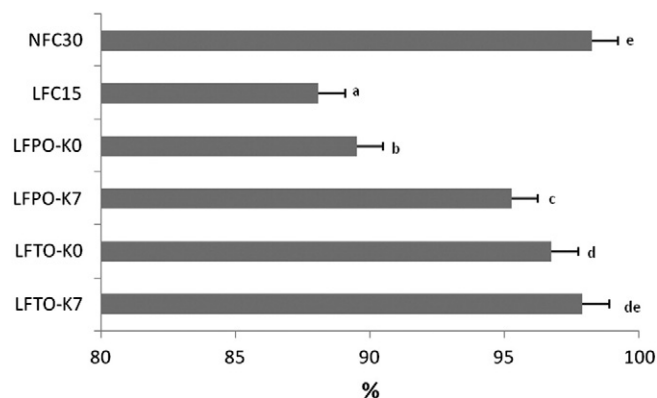


Fig. 1. Cooking yield (%) of different pâtés. NFC30: normal fat (30%) control pâté, sample formulated with pork backfat; LFC15: low fat (15%) control pâté, sample formulated with pork backfat; LFPO: low fat (15%) pâté formulated with partial pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); LFTO: low fat (15%) pâté formulated with total pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); in each case K0 and K7 indicate the addition of 0% and 7.5% of konjac gel respectively. Different letters (a,b,c,...) between samples indicates statistical differences ($P < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Cooking yield and proximate analysis

Cooking yield was affected ($P < 0.05$) by formulation (Fig. 1). In general, cooking yield values were lower the more water was added; in this way a negative correlation (-0.946 , $P < 0.01$) was established between the added water in the product (Table 1) and the cooking yield (Fig. 1). These cooking losses were mainly caused by water loss, irrespective of the product formulation (Delgado-Pando et al., 2011). This behaviour is consistent with the fact that fat was reduced by replacing the pork backfat with added water (in different proportions) (Table 1). The suggested explanation is that when fat reduction is accompanied by an increase in the proportion of moisture (lowering fat/moisture ratio) and protein levels remain the same (Table 2), there is a lower “effective” concentration of the protein acting to form the gel/emulsion matrix, thus reducing the water binding properties (Fig. 1). In contrast, Estévez, Ventanas and Cava (2005) reported that cooking yield improved with lower fat contents in liver pâté. Given that differences in cooking yield may be determined mainly by the proportion of added water (Delgado-Pando et al., 2011), the lipid material used in the product (pork fat or oil combination) would appear to influence cooking yield values less (Fig. 1). Similarly, little or no effect has been observed on meat emulsion stability due to the presence of different oils (peanut, high-oleic acid sunflower, sunflower, soy bean) (Ambrosiadis, Theodorakakos, Georgakis, & Lekkas, 1994; Hong et al., 2004a; Márquez et al., 1989; Park, Rhee, Keeton, & Rhee, 1989). Additionally, a negative correlation (-0.871 ; $P < 0.05$) was established between the total added water in the product (considering total added water

Table 2
Proximate analysis (%) of pâtés.

Sample	Moisture	Fat	Protein	Ash
NFC30	49.93 ± 0.57 ^a	30.60 ± 0.34 ^b	12.76 ± 0.54 ^a	3.23 ± 0.04 ^{abc}
LFC15	65.31 ± 0.44 ^{cd}	15.10 ± 0.50 ^a	13.86 ± 0.31 ^b	3.16 ± 0.00 ^a
LFPO-K0	65.95 ± 0.45 ^d	15.25 ± 0.88 ^a	13.53 ± 0.41 ^{ab}	3.15 ± 0.00 ^a
LFPO-K7	65.45 ± 0.21 ^{cd}	15.82 ± 0.29 ^a	13.56 ± 0.52 ^{ab}	3.28 ± 0.03 ^{bc}
LFTO-K0	63.88 ± 0.33 ^b	16.01 ± 0.27 ^a	13.95 ± 0.36 ^b	3.21 ± 0.02 ^{ab}
LFTO-K7	64.71 ± 0.39 ^{bc}	15.95 ± 0.15 ^a	14.10 ± 0.09 ^b	3.30 ± 0.02 ^c

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

as both the added water per se and the water in the added konjac gel) and cooking yield (Fig. 1). The fact that the correlation was lower than reported previously is consistent with the fact that the water in the konjac gel is embedded (bound) and hence is not available for formation of the protein matrix. Under these conditions, it is reasonable to expect that this portion of the water will have no clear effect on the water binding properties of the meat matrix (Delgado-Pando et al., 2011) and hence on cooking yield.

Proximate composition of the different samples (Table 2) was affected ($P < 0.05$) by formulation (Table 1). The moisture (49.9%) and fat (30.6%) contents of the normal fat sample (NFC30) differed significantly from the other samples (low-fat products), with values of 63.9–65.9% and 15.1–16% respectively. No differences ($P > 0.05$) in fat content were found among low fat pâtés (Table 2). Protein content ranged between 12.8 and 14.1%, with similar values ($P > 0.05$) for all low-fat pâtés. Small, and in some cases significant ($P < 0.05$), differences were found in ash content among samples (3.1%–3.3%). These results are similar to those reported by Delgado-Pando et al. (2011), where the same types of formulations were used, and they are consistent with the target composition (Table 1). Considerations regarding the effect of the reformulation process on product composition, and especially on energy content and fatty acid profile for these products, have been reported by Delgado-Pando et al. (2011).

3.2. Rheological analysis

3.2.1. Frequency sweep test

Dynamic frequency tests were carried out within the limits of the viscoelastic range to determine the angular frequency dependence of storage, loss and complex moduli (G' and G'' , G^* respectively) of the pâtés formulated with pork fat or oil combination (plant and marine origin), with or without added konjac gel (Fig. 2a–c). The rheological modulus values were modelled following the power law (Eqs. 1, 2 and 3) as suggested by Friedrich and Heymann (1988):

$$G^* = A_n \omega^{n^*} \quad (1)$$

$$G' = G'_0 \omega^{n'} \quad (2)$$

$$G'' = G''_0 \omega^{n''} \quad (3)$$

Fig. 2(a, b) shows that for all samples, elasticity prevailed over viscosity ($G' > G''$) throughout the frequency range. Both moduli were highly dependent on the frequency, as evidenced by the way that they increased with rising frequency. Thus, the resulting pâtés could be considered as a gel-like material with a network formed by a loosely-ordered structure with the consistency of a viscoelastic gel. The mechanical spectra of G' , G'' and G^* were similar in all the samples, the main differences appearing in the absolute values of these moduli (Fig. 2a–c). For instance, the values of G' were slightly higher in samples LFPO-K0 and LFC15, possibly due to the lower cooking yield and hence poorer emulsion stability in these pâtés (Fig. 1a) (Delgado-Pando et al., 2011). On the other hand, the samples showing greater emulsion stability expressed as cooking yield (NFC30, LFTO-K7, and LFPO-K7) had lower G' values. A similar trend was found for G'' and G^* .

Table 3 shows other viscoelastic parameters derived from G' , G'' and G^* mechanical spectra, which had been calculated after fitting the power law, as described elsewhere (Campo & Tovar, 2008). According to Zhou and Mulvaney (1998) and Campo and Tovar (2008), G'_0 and G''_0 (Eqs. 2 and 3) would indicate the resistance of the material to elastic and viscous deformation respectively, at an angular frequency of 1 rad/s. The difference $G'_0 - G''_0$ and the term A_n (Eq. 1) are magnitudes related to viscoelastic gel strength and to the strength of rheological unit interaction and can be used to assess

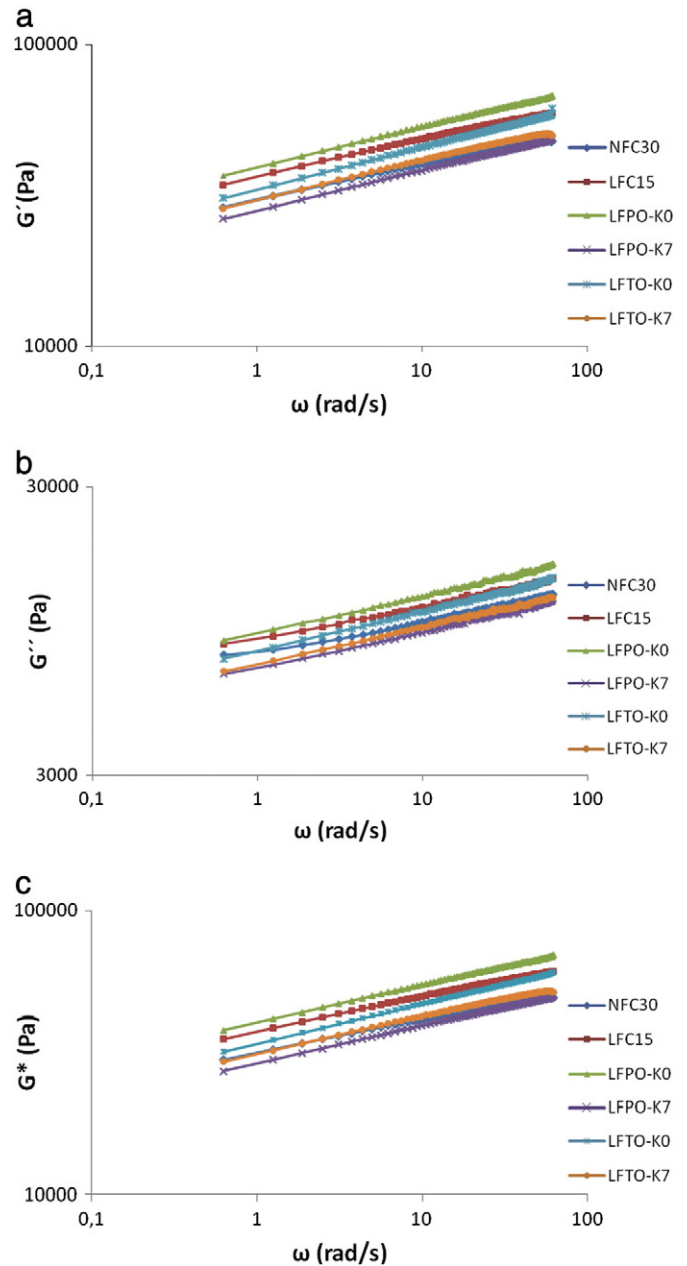


Fig. 2. Mechanical spectra data as a function of the angular frequency of different pâtés. Sample codes as in Fig. 1. (a) Elastic modulus (G' , Pa), (b) viscous modulus (G'' , Pa) and (c) complex modulus (G^* , Pa). $T = 25^\circ\text{C}$.

the firmness of gels (Campo & Tovar, 2008). Both $G'_0 - G''_0$ and A_n were highest in LFC15 and LFPO-K0 and lowest in LFPO-K7, with values closer to the product with normal fat content (NFC30). In the rest of the samples, values of these parameters were intermediate (Table 3). Thus, the reduced-fat pâtés made with animal fat (LFC15) and with partial replacement of pork fat with oil-in-water emulsion (LFPO-K0) were rather more rigid, firmer and stronger than the rest, which is consistent with the fact that they had the lowest water binding properties (Fig. 1). Moreover, the greater the rigidity ($> A_n$, $G'_0 - G''_0$), the poorer was the gel quality, as there was less stabilized water in the emulsion/gel structure, which appeared to occur in samples LFC15 and LFPO-K0. That being so, better water binding properties may be associated with greater structural strength linked to the breadth of the linear range. Thus, the samples with lower values of A_n and $G'_0 - G''_0$, like NFC30, LFTO-K0 and LFTO-K7 (Fig. 1; Table 4), had good binding properties. Total replacement

Table 3

Fitted values for the rheological parameters as determined in the frequency sweep test for the different pâtés.

Sample	$G'_0 \times 10^3$ kPa	$G''_0 \times 10^3$ kPa	$(G'_0 - G''_0) \times 10^3$ kPa	$A_n \times 10^3$ kPa	n'	n''	δ (°)
NFC30	31.52 ± 1.23	7.88 ± 0.02	23.64 ± 0.56	32.49 ± 0.86	0.109 ± 0.002	0.115 ± 0.004	15.08 ± 0.25
LFC15	37.50 ± 0.96	8.84 ± 0.04	28.66 ± 0.95	38.53 ± 1.05	0.115 ± 0.005	0.115 ± 0.005	13.30 ± 0.22
LFPO-K0	39.95 ± 0.84	9.26 ± 0.10	30.69 ± 1.26	41.01 ± 1.60	0.129 ± 0.007	0.133 ± 0.027	13.35 ± 0.12
LFPO-K7	28.60 ± 1.33	6.99 ± 0.21	21.61 ± 0.88	29.37 ± 0.69	0.130 ± 0.005	0.131 ± 0.018	12.97 ± 0.12
LFTO-K0	33.47 ± 1.08	8.05 ± 0.15	25.41 ± 1.03	34.46 ± 1.09	0.138 ± 0.018	0.139 ± 0.014	13.57 ± 0.12
LFTO-K7	31.34 ± 1.12	7.31 ± 0.22	24.03 ± 0.98	32.19 ± 0.95	0.123 ± 0.009	0.128 ± 0.009	13.36 ± 0.16

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation.

of animal fat by oil-in-water emulsion (LFTO) produced pâtés with better binding properties than those with partial replacement (LFPO) (Fig. 1); this is reflected in the mechanical spectra of the two samples (Fig. 2; Table 3). Phase angle (δ), represented by the ratio of G'' and G' , gives a relative measure of associated energy loss vs. energy stored in a cyclic deformation. In this study, (δ) varied between 12.97 and 15.08° (Table 3). The sample with the highest fat content (NFC30) and the best binding properties (Fig. 1) was the one with the largest phase angle, suggesting a more ordered structure in the matrix, although there were no great differences between samples. In each sample, the phase angle scarcely changed within the frequency range considered, which suggests that there were few structural changes in the matrixes.

Addition of konjac gel reduced the values of the difference $G'_0 - G''_0$, and of A_n in reduced-fat samples in which animal fat was partially replaced by oil-in-water emulsion (LFPO-K7), and to a lesser extent than where it was totally replaced (LFTO-K7). The rigidity and firmness of the products was so improved that sample LFTO-K7 exhibited similar values of A_n , $G'_0 - G''_0$ and of cooking yield to the product with normal fat content (NFC30) (Fig. 1; Table 3). This suggests that addition of konjac could help to limit the negative effects of fat reduction to give products with binding and rheological properties more like those of a normal fat product.

Another parameter derived after fitting the power law is the exponent n' , which is related to structural stability and protein network conformation in the samples: the higher the n' values, the greater was the instability of the matrix to frequency changes; it should be near-zero for gels exhibiting ideal elastic behaviour (i.e., no frequency dependence) and increase with increasing viscoelasticity (Zhou & Mulvaney, 1998). As shown in Table 3, n' values are slightly away from zero, ranging between 0.11 and 0.14, which indicates no great differences between samples. This is clear from Fig. 2, which shows that there was significant frequency-dependence. This parameter was lower in the normal-fat sample (NFC30) than in the rest of the samples indicating again that the NFC30 pâté had a slightly more stable structure with better elastic behaviour than the pâtés in which animal fat was partially or totally replaced by oil-in-water emulsion and/or konjac gel. Of the low fat samples containing oil-in-water emulsion, the LFTO-K7 showed a slightly lower value of n' , and this again was the sample with the best cooking yield and viscoelastic parameters most like the control, NFC30.

Table 4

Purge loss (%) for the different pâtés during chilling storage.

Sample	Storage (days)			
	7	20	43	85
NFC30	0.71 ± 0.08 ^{aA}	1.00 ± 0.27 ^{aA}	0.99 ± 0.19 ^{aA}	0.87 ± 0.16 ^{aA}
LFC15	3.57 ± 0.35 ^{cC}	3.41 ± 0.50 ^{cC}	1.70 ± 0.10 ^{bB}	1.08 ± 0.08 ^{aA}
LFPO-K0	1.66 ± 0.11 ^{bB}	1.67 ± 0.05 ^{bB}	1.66 ± 0.09 ^{bB}	1.06 ± 0.09 ^{aA}
LFPO-K7	1.72 ± 0.41 ^{bB}	1.67 ± 0.48 ^{bB}	0.75 ± 0.10 ^{aA}	1.01 ± 0.18 ^{aA}
LFTO-K0	1.79 ± 0.14 ^{bB}	1.67 ± 0.39 ^{bB}	1.26 ± 0.15 ^{abAB}	0.83 ± 0.09 ^{aA}
LFTO-K7	1.79 ± 0.10 ^{bC}	1.33 ± 0.19 ^{abBC}	0.83 ± 0.09 ^{abAB}	0.66 ± 0.17 ^{aA}

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences ($P < 0.05$).

3.2.2. Temperature sweep test

Fig. 3(a–c) shows the thermal behaviour of the different samples in terms of the elastic modulus (G'), the viscous modulus (G'') and the phase angle (δ) as a function of temperature (from 10 to 90 °C). As expected, the different compositions of the samples (fat and water content, type of fat and the presence or absence of konjac gel) affected the thermal behaviour of the pâtés. Fig. 3(a–c) shows that in all samples the elastic modulus (G') was higher than the viscous (G'') modulus throughout the temperature range studied, indicating the formation of a gel network but with a considerable presence of emulsion structures (viscous component).

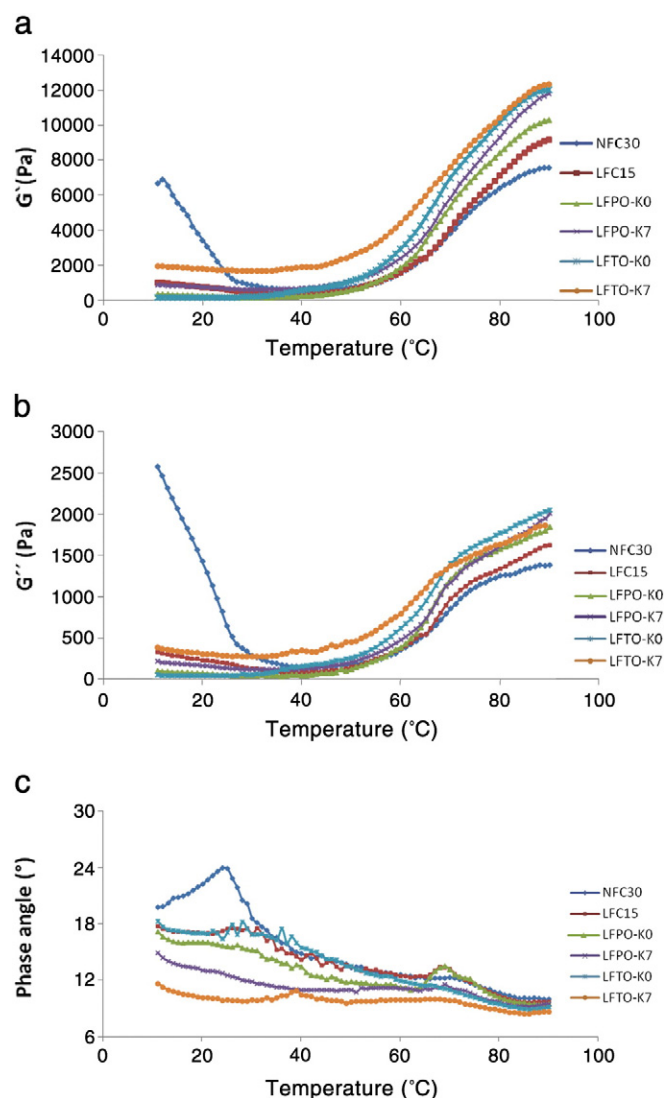


Fig. 3. Temperature sweep tests for the different pâtés. Sample codes as in Fig. 1. (a) Elastic modulus (G' , Pa), (b) viscous modulus (G'' , Pa) and (c) phase angle (°).

Table 5
Colour of pâtés during chilling storage.

Measure	Sample	Storage (days)				
		0	7	20	43	85
L*	NFC30	60.86 ± 0.37 ^{ba}	60.43 ± 0.55 ^{ba}	60.99 ± 0.55 ^{baB}	61.81 ± 0.49 ^{CB}	62.94 ± 0.43 ^{BC}
	LFC15	59.88 ± 0.27 ^{aA}	60.61 ± 0.28 ^{ba}	60.38 ± 0.55 ^{ba}	61.28 ± 0.47 ^{bcB}	62.89 ± 0.26 ^{BC}
	LFPO-K0	59.65 ± 0.22 ^{aAB}	59.31 ± 0.37 ^{aA}	59.19 ± 0.85 ^{aA}	60.47 ± 0.32 ^{abBC}	60.87 ± 0.67 ^{aC}
	LFPO-K7	60.41 ± 0.28 ^{abB}	59.45 ± 0.63 ^{aA}	59.53 ± 0.68 ^{aA}	60.24 ± 0.43 ^{aAB}	61.40 ± 0.29 ^{aC}
	LFTO-K0	62.47 ± 0.33 ^{ca}	62.33 ± 0.85 ^{ca}	62.42 ± 0.84 ^{ca}	62.94 ± 0.52 ^{da}	63.25 ± 0.42 ^{ba}
	LFTO-K7	59.67 ± 0.41 ^{aA}	60.31 ± 0.56 ^{baB}	60.47 ± 0.78 ^{baB}	59.77 ± 0.33 ^{aA}	60.67 ± 0.56 ^{aB}
	LFTO-K7	11.03 ± 0.28 ^{bb}	10.95 ± 0.10 ^{baB}	10.94 ± 0.14 ^{caB}	10.53 ± 0.34 ^{ba}	11.68 ± 0.30 ^{cc}
a*	NFC30	12.98 ± 0.22 ^{bc}	13.13 ± 0.21 ^{bcC}	12.96 ± 0.24 ^{bc}	12.43 ± 0.13 ^{bb}	11.65 ± 0.15 ^{ba}
	LFC15	14.02 ± 0.22 ^{cd}	13.88 ± 0.14 ^{cd}	13.50 ± 0.11 ^{cc}	13.00 ± 0.26 ^{cdB}	12.27 ± 0.10 ^{cdA}
	LFPO-K0	13.59 ± 0.18 ^{cBC}	13.77 ± 0.25 ^{deC}	13.59 ± 0.20 ^{cBC}	13.26 ± 0.15 ^{dB}	12.48 ± 0.40 ^{dA}
	LFPO-K7	13.30 ± 0.26 ^{bcC}	13.47 ± 0.05 ^{cdC}	13.36 ± 0.17 ^{cc}	12.93 ± 0.24 ^{cdB}	12.06 ± 0.24 ^{ca}
	LFTO-K0	11.17 ± 0.21 ^{aB}	11.12 ± 0.21 ^{aB}	11.10 ± 0.15 ^{aB}	10.95 ± 0.12 ^{aB}	10.30 ± 0.14 ^{aA}
	LFTO-K7	13.31 ± 0.20 ^{bcC}	12.77 ± 0.32 ^{bb}	12.81 ± 0.31 ^{bb}	12.65 ± 0.30 ^{bcB}	11.91 ± 0.35 ^{baA}
	LFTO-K7	12.19 ± 0.15 ^{ca}	12.29 ± 0.12 ^{ca}	12.05 ± 0.35 ^{da}	12.04 ± 0.31 ^{ca}	13.02 ± 0.33 ^{dB}
b*	NFC30	9.65 ± 0.16 ^{aAB}	9.98 ± 0.31 ^{aBC}	9.42 ± 0.22 ^{aA}	9.44 ± 0.22 ^{aA}	10.28 ± 0.38 ^{aC}
	LFC15	9.71 ± 0.27 ^{aBC}	10.08 ± 0.19 ^{aC}	9.38 ± 0.22 ^{aAB}	9.12 ± 0.35 ^{aA}	10.13 ± 0.12 ^{aC}
	LFPO-K0	10.91 ± 0.14 ^{bBC}	10.92 ± 0.07 ^{bBC}	10.45 ± 0.26 ^{ba}	10.50 ± 0.15 ^{baB}	10.96 ± 0.23 ^{bc}
	LFPO-K7	10.94 ± 0.24 ^{bb}	10.71 ± 0.31 ^{bb}	10.21 ± 0.49 ^{ba}	10.54 ± 0.28 ^{baB}	10.92 ± 0.21 ^{bb}
	LFTO-K0	12.19 ± 0.15 ^{ca}	12.29 ± 0.12 ^{ca}	12.05 ± 0.35 ^{da}	12.04 ± 0.31 ^{ca}	13.02 ± 0.33 ^{dB}
	LFTO-K7	11.03 ± 0.28 ^{bb}	10.95 ± 0.10 ^{baB}	10.94 ± 0.14 ^{caB}	10.53 ± 0.34 ^{ba}	11.68 ± 0.30 ^{cc}
	LFTO-K7	11.03 ± 0.28 ^{bb}	10.95 ± 0.10 ^{baB}	10.94 ± 0.14 ^{caB}	10.53 ± 0.34 ^{ba}	11.68 ± 0.30 ^{cc}

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences (P < 0.05).

All the low fat samples presented similar behaviour, with both G' and G'' showing little temperature-sensitivity below 45–50 °C. This could be because the myofibrillar meat proteins had been denatured during pâté manufacture and therefore did not undergo any of the conformational changes that normally take place at these temperatures. On the other hand, at these temperatures the liver-soluble proteins (major fraction in liver) are in their native state and do not undergo structural conformational changes. The main rheological changes during heating of samples occurred from 50 to 55 °C, when G' started to increase, up to 90 °C, indicating the formation of a stiff elastic matrix characteristic of heat-induced protein aggregates/gels, which is not complete at 90 °C. The fact that G' was still rising is consistent with the denaturation process undergone by liver-soluble proteins such as globulins (Feiner, 2006). Solubilized liver protein is a natural emulsifier, creating a three-dimensional matrix upon cooking which starts to denature at temperatures above 60 °C. This three-dimensional matrix inhibits the coalescence of fat particles, thus stabilizing the emulsion. The protein matrix in this type of products consists of strings of protein which help to form a thicker layer around droplets of fat and water, thus increasing the stability of the emulsion. These liver proteins prevent fat and water separation by forming a three-dimensional matrix which encapsulates droplets of fat and water (Feiner, 2006). However, the behaviour of the normal-fat pâté made with pork back fat (NFC30) was different to the rest of the samples, mainly at temperatures below 30 °C, with values of G' and G'' considerably higher than the rest of the samples (Fig. 3a,b). The drastic decrease of both moduli in NFC30 pâté up to temperatures of around 32–36 °C (Fig. 3a,b) is consistent with the melting of the pork back fat (Jiménez-Colmenero et al., 2012). In addition, both the increase and the final values of G' and G'' for this

sample were not as pronounced as in the other samples, indicating that NFC30 underwent less conformational change during heating than low fat pâtés made with an oil-in-water emulsion, and this again could be related to the high emulsion stability shown by this sample (Fig. 1) (Delgado-Pando et al., 2011).

Partial or total substitution of animal fat by oil-in-water emulsion and the incorporation of konjac gel brought about certain differences in the thermo-rheological profiles of the formulations as compared with the control sample (NFC30). In the earlier stages of heat processing (up to 50 °C), small differences were observed, which became more evident with increasing temperature. Animal fat reduction from 30 to 15% (NFC30 and LFC15 respectively) barely altered the profile between 30 and 70 °C, and values of G' and G'' were higher at the end of heating in samples with lower fat contents. The samples in which animal fat was totally replaced by a healthier oil combination (LFTO) presented higher elastic moduli from 50 °C upwards until the end of the heat treatment. Moreover, of the reduced-fat samples these were the ones with the greatest emulsion stability (Fig. 1). In general, either partial or total replacement of animal fat by oil-in-water emulsion, accompanied by less water addition, not only improved emulsion stability but also produced pâtés with higher elastic moduli (G') during heat treatment (Fig. 3a). Note that the spreadability and hence the elasticity of the finished product was greater the higher the concentration of unsaturated fatty acids, as can be seen in LFTO samples (Fig. 3a).

In all samples the changes in G'' were similar to those in G' up to 70 °C, although the magnitude of the G'' values was much smaller than that of the G' values. From 70 °C upwards, G'' did not increase as sharply as G' , which suggests that from this temperature upwards

Table 6
pH during chilling storage for the different pâtés.

Sample	Storage (days)				
	0	7	20	43	85
NFC30	6.75 ± 0.01 ^{ca}	6.76 ± 0.01 ^{cdA}	6.74 ± 0.02 ^{ca}	6.75 ± 0.02 ^{ba}	6.80 ± 0.02 ^{bb}
LFC15	6.76 ± 0.01 ^{cBC}	6.76 ± 0.01 ^{dB}	6.73 ± 0.03 ^{bcA}	6.74 ± 0.02 ^{baB}	6.77 ± 0.01 ^{aC}
LFPO-K0	6.73 ± 0.01 ^{ba}	6.73 ± 0.01 ^{ba}	6.72 ± 0.01 ^{ba}	6.72 ± 0.01 ^{aA}	6.77 ± 0.01 ^{aB}
LFPO-K7	6.76 ± 0.01 ^{cBC}	6.74 ± 0.02 ^{bcB}	6.71 ± 0.01 ^{abA}	6.74 ± 0.02 ^{bb}	6.77 ± 0.01 ^{aC}
LFTO-K0	6.71 ± 0.01 ^{aA}	6.70 ± 0.01 ^{aA}	6.69 ± 0.01 ^{aA}	6.70 ± 0.01 ^{aA}	6.74 ± 0.01 ^{aB}
LFTO-K7	6.72 ± 0.02 ^{abA}	6.72 ± 0.01 ^{abA}	6.72 ± 0.01 ^{abA}	6.71 ± 0.02 ^{aA}	6.75 ± 0.01 ^{aB}

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences (P < 0.05).

Table 7

Penetration texture parameters (penetration force, slope and gel strength) during chilling storage for the different pâtés.

Sample		Storage (days)				
		0	7	20	43	85
Penetration force (N)	NFC30	1.56 ± 0.04 ^{cB}	1.44 ± 0.08 ^{cAB}	1.30 ± 0.04 ^{dA}	1.38 ± 0.08 ^{dA}	1.81 ± 0.11 ^{cC}
	LFC15	0.81 ± 0.14 ^{aA}	0.77 ± 0.04 ^{aA}	0.78 ± 0.05 ^{aA}	0.80 ± 0.06 ^{aA}	1.19 ± 0.03 ^{abB}
	LFPO-K0	0.85 ± 0.05 ^{abAB}	0.81 ± 0.12 ^{aA}	0.81 ± 0.08 ^{aA}	0.87 ± 0.12 ^{abAB}	1.04 ± 0.10 ^{aB}
	LFPO-K7	1.03 ± 0.17 ^{bA}	1.04 ± 0.12 ^{bA}	1.03 ± 0.22 ^{bcA}	1.15 ± 0.09 ^{cdAB}	1.34 ± 0.22 ^{dB}
	LFTO-K0	0.90 ± 0.08 ^{abAB}	0.85 ± 0.09 ^{abA}	0.87 ± 0.12 ^{abA}	0.96 ± 0.07 ^{abAB}	1.09 ± 0.10 ^{aB}
	LFTO-K7	0.92 ± 0.09 ^{abA}	0.95 ± 0.15 ^{abA}	1.06 ± 0.07 ^{cA}	1.07 ± 0.04 ^{bcA}	1.11 ± 0.08 ^{aA}
	NFC30	0.62 ± 0.12 ^{bA}	0.60 ± 0.08 ^{bA}	0.56 ± 0.08 ^{bA}	0.65 ± 0.06 ^{bA}	1.03 ± 0.15 ^{bB}
Slope (N/mm)	LFC15	0.42 ± 0.08 ^{aAB}	0.36 ± 0.04 ^{aA}	0.46 ± 0.04 ^{abAB}	0.49 ± 0.07 ^{abAB}	0.59 ± 0.01 ^{aB}
	LFPO-K0	0.37 ± 0.09 ^{aA}	0.33 ± 0.12 ^{aA}	0.42 ± 0.08 ^{abA}	0.48 ± 0.12 ^{aAB}	0.59 ± 0.06 ^{aB}
	LFPO-K7	0.48 ± 0.03 ^{abAB}	0.35 ± 0.10 ^{aA}	0.38 ± 0.12 ^{aA}	0.47 ± 0.09 ^{aAB}	0.57 ± 0.08 ^{aB}
	LFTO-K0	0.37 ± 0.08 ^{aA}	0.39 ± 0.13 ^{aA}	0.38 ± 0.11 ^{aA}	0.50 ± 0.05 ^{abA}	0.52 ± 0.05 ^{aA}
	LFTO-K7	0.32 ± 0.03 ^{aA}	0.39 ± 0.09 ^{aA}	0.47 ± 0.03 ^{abA}	0.45 ± 0.07 ^{aA}	0.48 ± 0.11 ^{aA}
	NFC30	2.43 ± 0.23 ^{cB}	2.19 ± 0.33 ^{cAB}	1.75 ± 0.32 ^{dA}	1.73 ± 0.21 ^{cA}	1.99 ± 0.55 ^{cAB}
	LFC15	0.92 ± 0.11 ^{aA}	1.05 ± 0.21 ^{aA}	0.80 ± 0.11 ^{aA}	0.77 ± 0.08 ^{aA}	1.41 ± 0.07 ^{abcA}
Gel strength (N*mm)	LFPO-K0	1.23 ± 0.35 ^{abA}	1.23 ± 0.32 ^{aA}	0.98 ± 0.23 ^{abA}	0.94 ± 0.16 ^{abA}	1.09 ± 0.23 ^{aA}
	LFPO-K7	1.31 ± 0.36 ^{abA}	1.88 ± 0.39 ^{bcA}	1.69 ± 0.65 ^{cdA}	1.65 ± 0.28 ^{cA}	1.72 ± 0.41 ^{bcA}
	LFTO-K0	1.30 ± 0.39 ^{abA}	1.16 ± 0.20 ^{aA}	1.17 ± 0.10 ^{abcA}	1.01 ± 0.14 ^{abA}	1.26 ± 0.17 ^{abA}
	LFTO-K7	1.54 ± 0.39 ^{bA}	1.42 ± 0.31 ^{abA}	1.38 ± 0.22 ^{bcdA}	1.47 ± 0.15 ^{bcA}	1.51 ± 0.28 ^{abcA}

For sample denomination see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences ($P < 0.05$).

conditions favour interactions that confer elasticity rather than viscosity (Fig. 3a,b). The phase angle (δ) decreased very slightly when samples were heated from 10 to 90 °C in all low fat ones, and there were no major changes, particularly in the case of LFTO-K7, where there was practically no change at all (Fig. 3c). These behaviour patterns confirm that the structures of these meat matrixes are produced by the formation of a protein gel network with a considerable presence of emulsion-type characteristics (viscous component).

3.3. Chill storage properties

3.3.1. Purge loss

Purge loss was affected ($P < 0.05$) by formulation and storage time (Table 4), with significant interaction between them ($P < 0.05$). After 7 days of storage the highest ($P < 0.05$) purge losses occurred in LFC15 (over 3%), the sample with the highest proportion of added water (Table 1); on the other hand sample NFC30 had the highest fat and water binding properties, with purge loss values of 0.71% (Table 4). These results are consistent with the cooking yield (Fig. 1). Hong et al. (2004a, 2004b) and Hong, Lee, and Min (2004b) reported that purge loss in spreadable liver sausages also increased with the level of added water but found no effect when pork backfat was replaced with soybean oil.

Except in sample NFC30, purge loss was reduced ($P < 0.05$) in reformulated samples over storage, so much so that at day 85 of storage no significant ($P > 0.05$) differences were found between samples and values were around 1% (Table 4). This indicates that there is some reabsorption that improves the water and fat binding properties of the matrix, due largely to physical entrapment by the protein matrix produced following heat treatment. These results contrast with those reported by Hong et al. (2004a) in spreadable liver sausages, where the purge loss percentage increased during storage from around 0.25 to 1.25–1.75 after 21 days.

3.3.2. Colour

Colour parameters were affected by formulation and storage time (Table 5) with significant interaction between them ($P < 0.05$). As reported by Delgado-Pando et al. (2011) a reduction of fat levels (NFC30 vs. LFC15) in pâté favoured the appearance of darker colouring (paler and redder pâtés). Similarly, in low fat products the total or partial substitution of pork backfat by oil-in-water emulsion (LFC15 vs. LFPO and LFTO samples) produced an increase ($P < 0.05$) in b^* and a decrease ($P < 0.05$) in a^* . Konjac addition had no significant

effect in LFPO samples, but reduced ($P < 0.05$) lightness and yellowness and increased ($P < 0.05$) redness when the pork backfat was totally replaced by oil-in-water emulsion (LFTO-K0 versus LFTO-K7 sample).

Colour characteristics of liver pâtés changed ($P < 0.05$) during storage (Table 5). LFTO-K0 was the most colour-stable pâté during storage: lightness did not change ($P > 0.05$) over the 85 days, while redness and yellowness values remained similar ($P > 0.05$) over 43 days. Changes in lightness depended on the type of pâté. In control samples (NFC30 and LFC15) L^* had increased significantly by day 43 and by day 85 had reached its highest ($P < 0.05$) value. In the reformulated pâtés without konjac addition lightness peaked at day 85. The presence of konjac gel in samples (LFPO-K7 and LFTO-K7) produced small quantitative changes in lightness throughout storage. Generally, redness decreased gradually over time, reaching its lowest value ($P < 0.05$) in all samples at day 85. Yellowness reached its highest values for all samples (except LFPO-K7) at day 85, but no pattern is apparent. (Hong et al., 2004a) found that storage had no effect on the colour of spreadable liver sausage in which pork backfat was replaced by soybean oil. As in this experiment, Estévez and Cava (2004) reported that lightness in liver pâtés increased during refrigerated storage but that changes in a^* and b^* differed depending on the pig source. In general, changes in colour parameters were not quantitatively important despite the statistically significant differences.

3.3.3. pH

The pâtés presented small (but significant) differences in pH as affected by formulation and storage (Table 6), ranging from 6.69 to 6.80. Other authors have reported similar values in this kind of liver product (Estévez, Ventanas, Cava, & Puolanne, 2005; Perlo et al., 1995). By day 85 of chill storage pH had increased ($P < 0.05$) in most samples. In general, changes were not quantitatively important despite the statistically significant differences.

3.3.4. Penetration test

Texture parameters of pâtés (Table 7) showed significant differences ($P < 0.05$) between types of formulation and storage time, with interaction between them ($P < 0.05$) except for gel strength ($P > 0.05$). As regards the effect of formulation (day 0 of storage) fat reduction (NFC30 vs. LFC15) produced a decrease ($P < 0.05$) of slope (S), penetration force and gel strength (GS). Compared to the low-fat control (LFC15), textural parameters were not affected ($P > 0.05$) by partial or total pork backfat replacement with oil-in-water emulsion; likewise, in the reformulated

low-fat pâtés the addition of konjac generally caused no significant changes in texture. Similar results have been reported previously: fat reduction produced a decrease in the textural parameters and fat replacement had no effect on the texture of the pâtés (Delgado-Pando et al., 2011). At day 0 of storage, a correlation was established between PF ($P < 0.01$; 0.970), GS ($P < 0.01$; 0.936), and S ($P < 0.05$; 0.856) and the fat:moisture ratio of the pâtés, meaning that the higher the fat:moisture ratio, the harder the pâté was (high values of PF and GS). Similar results were reported by Hong et al. (2004b), who found that the spreadability of liver sausages improved as the water level increased. On the contrary, Estévez, Ventanas and Cava (2005) observed that the hardness of pâtés increased when the fat:moisture ratio decreased.

Changes of texture parameters of the pâtés over storage were conditioned by formulation (Table 7). In normal-fat control sample (NFC30), PF had decreased ($P < 0.05$) at 20 days, but reached its highest level at the end of storage; slope remained constant ($P > 0.05$) over storage and was found to have increased ($P < 0.05$) only at 85 days. GS varied ($P < 0.05$) during storage, but values were similar ($P > 0.05$) at the beginning and the end of storage. Sample LFC15, which also had only pork backfat as a fat source (but only 15%), did not follow the same pattern; PF was only greater ($P < 0.05$) at 85 days of storage; there was no clear trend in the slope, and there were no significant variations ($P > 0.05$) in GS throughout storage.

In the case of pâtés with partial or total pork backfat replacement (LFPO-K0 and LFTO-K0), PF followed the same trend, with similar values ($P > 0.05$) at the beginning and end of the study. In these products S generally remained unchanged throughout storage, and only in the case of LFPO-K0 was there an increase ($P < 0.05$) at 85 days of storage. In both products there was no variation ($P > 0.05$) in GS throughout storage (Table 7). The effect of konjac gel addition on the pâtés differed depending on whether pork backfat replacement was partial or total. In LFPO-K7, PF had increased ($P < 0.05$) by the end of storage, whereas in LFTO-K7 there were no significant changes over the storage period (Table 7). In S there were only slight variations in LFPO-K7 and none ($P > 0.05$) in LFTO-K7 throughout storage. In both products there was no variation ($P > 0.05$) in GS throughout storage (Table 7).

Changes in textural properties of meat products during chill storage have been attributed to: changes in purge loss, drying, emulsion destabilization, formulation, functionality of meat proteins, and others (Andrés, García, Zaritzky, & Califano, 2006; Candogan & Kolsarici, 2003; Cavestany, Jiménez-Colmenero, Solas, & Carballo, 1994; Estévez, Ventanas, & Cava, 2006, among others). The textural behaviour of the pâtés cannot be explained in terms of the changes in purge loss (Table 4) since no clear relationship can be established. An increase of hardness during chill storage has also been reported in pork liver pâté (Estévez et al., 2006) and in ostrich liver pâtés (Fernández-López, Sayas-Barberá, Sendra, & Pérez-Álvarez, 2004). A slight improvement in consistency has been reported in pâtés containing olive oil and cis-linoleic acid as pork backfat replacer after 71 days of chill storage (Martín et al., 2008). On the contrary, storage time did not significantly affect the hardness of spreadable liver sausage with pork backfat replaced by soybean oil (Hong et al., 2004a), although the storage period only lasted 21 days.

4. Conclusions

The reformulation process for n-3 PUFA enriched/konjac low-fat pork liver pâtés in which pork backfat is replaced by an oil-in-water emulsion containing a mixture of olive, linseed and fish oils, affected the rheological properties of the meat systems and the technological behaviour of these healthier meat products during chill storage. These changes seem to be associated with the presence of water, the healthier oil combination and the konjac gel. In addition to the nutritional advantages (fatty acid profile) and good sensory attributes (Delgado-Pando et al., 2011), chill storage did not adversely affect the technological quality of the pâtés.

Acknowledgement

This research was supported by projects AGL2007-61038/ALI and AGL2008-04892-CO3-01 in the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) and the Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016), Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- Ambrosiadis, I., Theodorakakos, N., Georgakis, S., & Lekkas, S. (1994). Influence of thawing methods on the quality of frozen meat and the drip loss. *Fleischwirtschaft*, 74(3), 320–330.
- Andrés, S. C., García, M. E., Zaritzky, N. E., & Califano, A. (2006). Storage stability of low-fat chicken sausages. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 311–319.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (17th edition ed.). Maryland (USA): Association of Official Analytical Chemistry.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Campo, L., & Tovar, C. (2008). Influence of the starch content in the viscoelastic properties of surimi gels. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 140–147.
- Candogan, K., & Kolsarici, N. (2003). The effects of Carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. *Meat Science*, 64(2), 199–206.
- Carballo, J., Fernández, P., & Jiménez Colmenero, F. (1996). Texture of uncooked and cooked low- and high-fat meat batters as affected by high hydrostatic pressure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1624–1625.
- Cavestany, M., Jiménez-Colmenero, F., Solas, M. T., & Carballo, J. (1994). Incorporation of sardine surimi in bologna sausage containing different fat levels. *Meat Science*, 38(1), 27–37.
- D'Arrigo, M., Hoz, L., Cambero, I., Lopez-Bote, C. J., Pin, C., & Ordonez, J. A. (2004). Production of n-3 fatty acid enriched, pork liver pate. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 37(6), 585–591.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Science*, 88(2), 241–248.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: An approach for the development of functional meat products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7), 791–801.
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pate. *Meat Science*, 68(4), 551–558.
- Estévez, M., Ventanas, J., Cava, R., & Puolanne, E. (2005). Characterisation of a traditional Finnish liver sausage and different types of Spanish liver pates: A comparative study. *Meat Science*, 71(4), 657–669.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pate as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92(3), 449–457.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2006). Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pate. *Meat Science*, 74(2), 396–403.
- Feiner, G. (2006). *Meat Products Handbook. Practical science and technology*. Cambridge (England): Woodhead Publishing.
- Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2004). Quality characteristics of ostrich liver pate. *Journal of Food Science*, 69(2), S85–S91.
- Friedrich, Chr, & Heymann, L. (1988). Extension of a model for crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 32, 235–241.
- García-Iníguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M. I., Caverio, R. Y., Navarro-Blasco, I., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2010). Selenium, iodine, omega-3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: A combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat Science*, 85(2), 274–279.
- Hong, G., Lee, S., & Min, S. (2004). Effects of replacement pork backfat with soybean oil on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology*, 13(1), 51–56.
- Hong, G., Lee, S., & Min, S. (2004). Effects of substituted level of added water for fat on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology*, 13(4), 397–402.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. *Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. Trends in Food Science and Technology*, 18, 567–578.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A. M., Fernández-Martín, F., Rodríguez-Salas, L., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats. *Food Hydrocolloids*, 26, 63–72.
- Kaack, K., & Pedersen, L. (2005). Low-energy and high-fibre liver pate processed using potato pulp. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 278–282.
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat Science*, 83(1), 148–154.
- Márquez, E. J., Ahmed, E. M., West, R. L., & Johnson, D. D. (1989). Emulsion stability and sensory quality of beef frankfurters produced at different fat and peanut oil levels. *Journal of Food Science*, 54(867–870), 873.

- Martín, D., Antequera, T., Muriel, E., Pérez-Palacios, T., & Ruiz, J. (2009). Liver pate from pigs fed conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology*, 228(5), 749–758.
- Martín, D., Ruiz, J., Kivikari, R., & Puolanne, E. (2008). Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver pates: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. *Meat Science*, 80(2), 496–504.
- Paneras, E. D., Bloukas, J. G., & Filis, D. G. (1998). Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *Journal of Muscle Foods*, 9, 111–126.
- Park, J., Rhee, S. K., Keeton, J. T., & Rhee, K. C. (1989). Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils. *Journal of Food Science*, 54(3), 500–504.
- Perlo, F., Gagogago, A., Rosmini, M., Cervera-Pérez, R., Pérez-Álvarez, J., Pagan-Moreno, M., López-Santovenia, F., & Aranda-Catala, V. (1995). Modification of physico-chemical and colour parameters during the marketing of “paté”. *Meat Science*, 41(3), 325–333.
- Tye, R. J. (1991). Konjac flour: Properties and applications. *Food Technology*, 45(3), 82–92.
- Viana, F. R., Silva, V. D. M., Delvivo, F. M., Bizzotto, C. S., & Silvestre, M. P. C. (2005). Quality of ham pate containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, 70(1), 153–160.
- Zhang, H., Yoshimura, M., Nishinari, K., Williams, M. A. K., Foster, T. J., & Norton, I. T. (2001). Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights. *Biopolymers*, 59(1), 38–50.
- Zhou, N., & Mulvaney, S. J. (1998). The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2561–2571.

IV.1.6. Enriched n-3 PUFA/konjac gel low-fat pork liver pâté: lipid oxidation, microbiological properties and biogenic amine formation during chilling storage

Meat Science, 2012, 92, 762-767



Enriched n — 3 PUFA/konjac gel low-fat pork liver pâté: Lipid oxidation, microbiological properties and biogenic amine formation during chilling storage

G. Delgado-Pando, S. Cofrades, C. Ruiz-Capillas, M. Triki, F. Jiménez-Colmenero *

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) (Formerly Instituto del Frío), Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2012

Received in revised form 1 June 2012

Accepted 22 June 2012

Keywords:

Low-fat pork liver pâté

Enriched n — 3 PUFA

Konjac

Lipid oxidation

Biogenic amines

Microbiology

ABSTRACT

Low-fat pork liver pâtés enriched with n — 3 PUFA/konjac gel were formulated by replacing (totally or partially) pork backfat by a combination of healthier oils (olive, linseed and fish oils) and konjac gel. Lipid oxidation, microbiological changes and biogenic amine (BA) formation were studied in healthier-lipid pâtés during chill storage (85 days, 2 °C). Increasing unsaturated fatty acid levels favoured lipid oxidation, although the levels reached were low throughout the storage period, ranging from 0.113 to 0.343 mg malonaldehyde/kg sample. Neither the formulation nor the time in storage affected the microbial load. Biogenic amine contents of products (the sum of initial concentrations and amines formed during storage) varied according to the type of BA but were far below levels that could constitute a consumer health hazard.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Liver pâté is a cheap cooked meat product traditionally consumed around the world. The main ingredients used in the manufacture of pork liver pâté are meat industry by-products (pork backfat, liver, and sometimes low category meat). These ingredients are a source of saturated fatty acids (SFA) and provide a considerable proportion of the fat (around 30%) and energy (around 350 kcal/100 g) contents of the final product. Reformulation has been used as a strategy for reducing the fat content and improving the quality of the lipid profile of liver pâté to help conform to health recommendations (D'Arrigo et al., 2004; Delgado-Pando, Cofrades, Rodríguez-Salas, & Jiménez-Colmenero, 2011a; Estévez, Ventanas, & Cava, 2005; Martín, Ruiz, Kivikari, & Puolanne, 2008, among others). What these strategies seek to achieve is to reduce SFAs and increase polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially long-chain n — 3 PUFAs, thus improving the n — 6/n — 3 PUFA and PUFA/SFA ratios, and if possible achieving zero cholesterol (Jiménez-Colmenero, 2007). It has been suggested that foods that are strategically or naturally enriched in healthier fatty acids can be used to achieve desired biochemical effects without the ingestion of supplements or changes in dietary habits.

In this context, in a previous paper (Delgado-Pando et al., 2011a) the suitability of a reformulated reduced-fat pâté in which part or all of the pork backfat was replaced with a healthier (marine and plant origin) oil-in-water emulsion and konjac gel was assessed. The healthier lipid

combination was composed of a mixture of olive, linseed and fish oils in suitable proportions to achieve healthier (better fatty acid profile) intake goals. The nutritional advantages offered by the reformulated pâtés were reduced energy content (by more than 100 kcal/100 g) and improved fatty acid profile (lower SFA and higher n — 3 PUFA contents). Additionally, characteristics such as the dynamic rheological properties of meat batters and the technological properties of these products during chill storage have been reported (Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Triki, & Jiménez-Colmenero, 2012). A further interesting feature of the new pâté formulation was the use of konjac as a fat substitute (an application not hitherto tried in pâté-type products); this ingredient possesses important technological properties (water holding capacity, gelling and thickening) and potential health implications (e.g. reducing cholesterol, insulin and glucose levels or satiating and laxative effects) (Tye, 1991; Zhang et al., 2001). The results as regards nutritional, technological and sensory characteristics as well as technological properties during chill storage showed that it is possible to produce such healthier pâtés. However, additional studies are needed on lipid oxidation, microbiology and biogenic amine formation of the new pâté during chill storage in order to gain a clearer understanding of these products and make a more accurate assessment of the suitability of this strategy for healthier pâté reformulation.

Lipid oxidation is a major cause of deterioration in the quality of stored meat products. Susceptibility to lipid oxidation can be augmented by increasing concentrations of unsaturated fatty acids (particularly polyunsaturated), and also by some processing conditions like grinding, cooking, etc. which entail exposure to high temperatures, decompartmentalization of prooxidants and antioxidants or enhanced access of oxygen to the substrate (Lee et al., 2006); some

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.
E-mail address: fjimenez@ictan.csic.es (F. Jiménez-Colmenero).

of these factors determining the scale of this phenomenon are present in the reformulation and processing of healthier lipid pâté. In fact one of the main potential problems associated with healthier lipid formulations in meat products is how they may influence lipid oxidation, which in turn affects quality and has health implications.

Biogenic amines (BA) are toxic compounds formed by the decarboxylation of free amino acids from the action of amino acid decarboxylase enzymes, mainly of microbial origin. This reaction is influenced by processing and storage conditions among other factors (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004). BAs are important as a quality index and because they have negative health implications. There are numerous studies of biogenic amines in different meat products (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004), but to the authors' knowledge there have been no studies on the presence of BAs in pâtés and hence in healthier-lipid reformulated pâtés. This may be because little importance has been attached to BA formation given the small microbial load in such products and the heat treatment to which they are subjected. However, there are two aspects which suggest that they are worth studying: one is that heat treatment does not eliminate BAs already present in the raw materials, which are incorporated in the product to an extent that varies depending on the microbiological quality of the meat raw material. The other is that during long-term chilling of these products conditions frequently arise which favour microbial growth and hence BAs formation. Moreover, it is especially important to study the microorganisms in products of this kind during prolonged chilled shelf-life, since they are consumed without further cooking. These aspects may affect healthier-lipid pâtés in a different way as there are factors associated with the reformulation process (ingredient modifications, handling conditions, etc.) which decisively influence the factors responsible for the formation of biogenic amines (microorganisms, pH, free amino acids, etc.) and hence their profile and final concentrations. It is essential to understand how biogenic amine formation is affected by the reformulation process in order to assess their potential presence in these meat products.

For all the foregoing reasons, the aim of this study was to assess lipid oxidation, microbiological changes and biogenic amine formation in healthier-lipid pâtés during chill storage (85 days, 2 °C). The new products were reformulated to produce better lipid compositions by reducing fat content and/or replacing the pork backfat with an oil (healthier lipid combination)-in-water emulsion and konjac. As far as the authors are aware, no published research addresses reformulation strategies for new healthier-lipid pâtés reported here (Delgado-Pando et al., 2011a).

2. Materials and methods

2.1. Materials, healthy pâté preparation and chilled storage

The meat raw materials and procedures used for the manufacture of oil-in-water emulsions and konjac gel were as reported by Delgado-Pando et al. (2011a). Briefly, fresh post-rigor pork meat (mixture of *M. biceps femoris*, *M. semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. gracilis* and *M. adductor*), Iberian pork backfat and pork liver were obtained from a local market. The oil-in-water emulsion (O/SPI) was prepared with 2.26% soy protein isolate (Vicoprot, TRADES S.A., Barcelona, Spain), 42.11% water and a 52.63% oil combination containing 44.39% olive oil (Carbonell Virgen Extra, SOS Cuétara SA, Madrid, Spain), 37.87% linseed oil (Natursoy S.L., Alimentos Ecológicos, Castellterçol, Spain) and 17.74% fish oil (Omevital 18/12 TG Gold, Cognis GMBH, Illertissen, Germany). The konjac gel (KG) was prepared with 81% water, 5% konjac flour (glucomannan 83%, 120 mesh, Trades S.A., Barcelona, Spain), 3% pre-gelled corn starch (Amigel, Julio Criado S. L., Madrid, Spain), 1% i-carrageenan (Secolata IP, Hispanagar, Burgos, Spain) and 10% Ca(OH)₂ solution (1%) (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Spain).

Six different formulations were studied (Table 1): two control samples (all pork fat), one with normal (30%) fat content (NFC30)

similar to the commercial product, and another with low (15%) fat content (LFC15). Two low fat (15%) samples were also formulated with partial substitution of pork backfat by the oil-in-water emulsion and without (LFPO-K0) and with added (7.5%) konjac gel (LFPO-K7). Finally two other low fat (15%) samples were formulated with total substitution of pork backfat by the oil-in-water emulsion without (LFTO-K0) and with added (7.5%) konjac gel (LFTO-K7). These were the formulations that presented the best characteristics (nutritional, technological and sensory) of those studied previously (Delgado-Pando et al., 2011a). The specific conditions for preparation of these pâtés are detailed in Delgado-Pando et al. (2011a). After production, raw pâté batters (50 ± 2 g), were placed in plastic containers (length 11.5 cm, diameter 2.7 cm) and heated to 80 °C (Delgado-Pando et al., 2011a). When processing was completed, the pâtés were cooled in a water bath (5–10 °C), stored under refrigeration (2 ± 2 °C) for 85 days and analysed periodically.

2.2. Lipid oxidation

Oxidative stability was evaluated on the basis of changes in thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). The procedure for measurement of TBARS was based on methods used by Rosmini et al. (1996) with some modifications. Briefly, the procedure was as follows: 4 g aliquots of each sample were placed in centrifuge tubes. 1 mL of distilled water and 10 mL of 10% trichloroacetic acid (Panreac Química SAU, Castellar del Vallés, Spain) were added and the mixture was homogenized for 30 s with a vortex stirrer. Then, 5 mL of 20 mM 2-thiobarbituric acid (Merck KGaA, Dannstadt, Germany) was added and the mixture was stirred again for 30 s. Each tube was centrifuged for 5 min at 2600 g (Heraeus Multifuge 3 L-R, DJB Labcare Ltd., Buckinghamshire, UK) and the supernatant was collected and kept in darkness for 20 h at 20 ± 2 °C. Pink colour formation was measured spectrophotometrically (Lambda 15UV/VIS spectrophotometer, Perkin-Elmer, USA) at 532 nm. A calibration curve was plotted with 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to obtain the malonaldehyde (MDA) concentration and results were expressed as mg MDA/kg of sample. The results are averages of at least 2 determinations from three extractions per sample.

2.3. Microbiological analysis

Samples were prepared in a vertical laminar-flow cabinet (model AV 30/70, Telstar, Madrid, Spain). For each sample, 10 g (in replicate) was taken and placed in a sterile plastic bag (Sterilin, Stone, Staffordshire, UK) with 90 mL of peptone water (0.1%). After 1 min in a stomacher blender (Colworth 400, Seward, London, UK), appropriate decimal dilutions were pour-plated on the following media: Plate

Table 1
Formulation (%) of the different pâtés.^a

Sample	Meat	Pork liver	Pork backfat	O/SPI	Konjac gel	Water
NFC30	19.2	33.0	31.5	0.0	0.0	10.5
LFC15	19.2	33.0	14.6	0.0	0.0	27.4
LFPO-K0	19.2	33.0	7.3	12.3	0.0	22.4
LFPO-K7	19.2	33.0	7.3	12.3	7.5	14.9
LFTO-K0	19.2	33.0	0.0	24.6	0.0	17.4
LFTO-K7	19.2	33.0	0.0	24.6	7.5	9.9

The following were also added to each sample: 2 g/100 g milk powder, 2 g/100 g sodium chloride, 1 g/100 g sodium caseinate, 0.025 g/100 g sodium ascorbate, 0.5 g/100 g sodium tripolyphosphate, 0.015 g/100 g sodium nitrite and 0.3 g/100 g flavouring.

^a NFC30: normal fat (30%) control pâté, sample formulated with pork backfat; LFC15: low fat (15%) control pâté, sample formulated with pork backfat; LFPO: low fat (15%) pâté formulated with partial pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); LFTO: low fat (15%) pâté formulated with total pork backfat replacement by oil-in-water emulsion (O/SPI); in each case K0 and K7 indicate the addition of 0% and 7.5% of konjac gel respectively.

Count Agar (PCA) (Merck, Germany) for total viable count (30 °C for 72 h) and Violet RedBile Glucose Agar (Merck, Germany) for *Enterobacteriaceae* (30 °C for 24 h). The results were expressed as logarithms of colony forming units per gram (log cfu/g).

2.4. Analysis of biogenic amines (BA) by ion-exchange chromatography

Tyramine, phenylethylamine, histamine, putrescine, cadaverine, tryptamine, agmatine, spermidine and spermine were determined in an extract prepared by blending 25 g of each sample with 50 mL of 7.5% trichloroacetic acid in an UltraTurrax homogenizer (IKA-Werke, Janke, & Kunkel, Staufen, Germany) (20,000 rpm, 3 min) and centrifuged at 5000 g for 15 min at 4 °C in a desktop centrifuge (Sorvall RTB6000B, DuPont, USA). The supernatants were filtered through a 0.45 µm Millipore filter, and 10 µL of this filtrate was injected into an HPLC model 1022 (Perkin Elmer) with a Pickering PCX 3100 post-column system (Pickering Laboratories, Mountain View, CA, USA) following the methodology of Triki, Jiménez-Colmenero, Herrero, & Ruiz-Capillas (2012). The results are averages of at least two determinations from two extractions per sample.

2.5. Statistical analysis

The repeated measures test was used for statistical comparisons between samples. Data were analysed using IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) for two-way ANOVA. Least squares differences were used for comparison of mean values among treatments and Tukey's HSD test was used to identify significant differences ($P < 0.05$) between formulations and storage times. Each product was prepared in duplicate.

3. Results and discussion

Lipid modification of meat products by fat reduction and/or substitution of animal fat with other lipid sources has been shown to be a good strategy to improve their nutritional quality. Reformulation of pâté has been used to achieve better lipid compositions that are more in line with health recommendations and nutrient intake goals. However, the necessary compositional changes can entail consequences for processing and product characteristics. In a previous paper Delgado-Pando et al. (2011a) reported the proximate composition, nutritional benefits and technological and sensory properties of a healthier-lipid pâté reformulated by reducing fat content and/or replacing the pork backfat with an oil (healthier-lipid combination)-in-water emulsion and konjac. Additionally characteristics such as the dynamic rheological properties of meat batters and the technological properties (purge loss, colour, pH and texture) of these products during chill storage have been reported (Delgado-Pando et al., 2012). The following sections deal with aspects relating to shelf-life characteristics and safety essential to gain a clearer understanding of these products.

3.1. Lipid oxidation

Lipid oxidation in healthier-fat meat product formulations varies according to the nature of the product, the type, amount and means of addition of non-meat fats, and the presence of antioxidants (Jiménez-Colmenero, 2007). In the case of pâtés, TBARS values were affected ($P < 0.05$) by formulation and storage (Table 2), with interaction ($P < 0.05$) between both factors. Lipid oxidation was low throughout storage, ranging from 0.113 to 0.343 mg MDA/kg of sample, well below the reported minimum needed to detect objectionable flavours in processed meat products (Cáceres, García, & Selgas, 2008; Mercadante, Capitani, Decker, & Castro, 2010). Generally the lowest TBARS values ($P < 0.05$) were registered in the control samples (NFC30 and LFC15) and the highest ($P < 0.05$) in the total pork backfat replacement low-fat samples (LFTO-K0 and LFTO-K7). These results are

consistent with the different levels of unsaturation in meat products. As reported previously (Delgado-Pando et al., 2011a), in these experimental conditions pâtés produced with an oil combination had lower levels of SFA (LFPO 27.42% and LFTO 21.34%) and monounsaturated fatty acids (LFPO 49.77% and LFTO 42.48%) and higher levels of PUFA (LFPO 22.40% and LFTO 35.64%) than control pâtés (32.33, 58.34 and 9.04% respectively). Increasing unsaturated fatty acid levels (specially PUFA), and also some processing conditions which facilitate interaction between fatty acids and oxygen, result in increased susceptibility to lipid oxidation (Lee et al., 2006). Generally, TBARS values were significantly higher ($P < 0.05$) in samples with partial pork backfat replacement than control samples and lower ($P < 0.05$) than in LFTO samples. Reducing the fat content in pâtés did not significantly affect lipid oxidation, except for day 85, both control samples (NFC30 and LFC15) had similar ($P > 0.05$) TBARS values during the storage period (Table 2). Contrasting with this result, Estévez et al. (2005) reported significantly higher levels in high fat pâtés (31.2% fat content) than in low fat pâtés (20.5% fat content). Konjac addition in the reformulated samples led to lower TBARS values ($P < 0.05$) when added to total pork backfat replacement (LFTO) samples. However, there was no significant effect ($P > 0.05$) among LFPO samples, where oxidation values were similar except at 85 days.

During storage TBARS followed a similar pattern in all samples. Values increased significantly ($P > 0.05$) until 20 days of storage in control samples and until 43 days in reformulated pâtés (Table 2). After that increase, TBARS values in LFPO and LFTO samples decreased significantly ($P < 0.05$) by day 85 of storage. TBARS also decreased ($P < 0.05$) in both control samples (normal and low fat), but only up to day 43 of storage. After that the value increased ($P < 0.05$) in LFC15 and decreased ($P > 0.05$) in NFC30. This behaviour, a peak followed by a decline of the TBARS value, has been reported during frozen storage of ground beef (Bhattacharya, Hanna, & Mandigo, 1988) and in low-fat healthier frankfurters (Delgado-Pando et al., 2011b). The decline in the TBARS values has been attributed to interaction between some meat proteins and thiobarbituric acid-reactive substances (Bhattacharya et al., 1988). In liver pâté, on the other hand, TBARS has been found to increase with storage (90 days) (Estévez, Ramírez, Ventanas, & Cava, 2007).

Pâtés have been described as being highly susceptible to oxidation because they are highly processed products with high fat levels and low concentrations of natural antioxidants (Russell, Lynch, Lynch, & Kerry, 2003). There are several factors that may increase oxidation during the manufacture of meat products: salting is known to increase prooxidant activity of iron in myofibrillar foods (Decker & Xu, 1998; Murphy, Kerry, Buckley, & Gray, 1998; Tang, Kerry, Sheehan, Buckley, & Morrissey, 2001); reduction in particle size during preparation increases the exposure of labile compounds to oxygen; and thermal treatment causes protein denaturation, loss of enzyme activity and release of non-haem iron (which catalyses lipid oxidation) (Decker & Xu, 1998). As noted earlier, the increase of unsaturated fatty acid contents in the reformulated pâtés favoured lipid oxidation. Nevertheless, although all these factors were present in the present study, there was relatively little lipid oxidation. There are various factors that may explain this behaviour. One is that the temperature reached at the thermal centre of the pâtés, 80 °C, is relatively high. At this temperature and above, the Maillard reaction products that form act as oxidation protectors, and oxidation rates are lower in meat subjected to high temperatures and/or prolonged heating than in meat subjected to lower temperatures for shorter periods of time (Bailey, Shi-Lee, Dupuy, St. Angelo, & Vercellotti, 1987; Cross, Leu, & Miller, 1987). Another is the protective effect of the antioxidants (naturally-occurring or added) in the oils of the oil-in-water emulsions. Nitrite and ascorbate act as antioxidants (Márquez, Ahmed, West, & Johnson, 1989), as do tocopherols and phenolic compounds in the vegetable and fish oils (Bloukas, Paneras, & Fournitzis, 1997). No changes were reported in TBARS values during 70 days of chill storage in reformulated (with conjugated linoleic acid oil and olive oil) liver pâtés, probably due to the antioxidative effect of nitrite. Another factor may be the protective effect of soy protein isolate

Table 2
Lipid oxidation (TBARS values, mg MDA/kg sample) of pâtés during chill storage.¹

Sample	Storage (days)				
	0	7	20	43	85
NFC30	0.119 ± 0.002 ^{aAB}	0.131 ± 0.004 ^{aB}	0.151 ± 0.008 ^{aC}	0.126 ± 0.007 ^{aAB}	0.115 ± 0.007 ^{aA}
LFC15	0.113 ± 0.004 ^{aA}	0.133 ± 0.002 ^{aBC}	0.149 ± 0.015 ^{aC}	0.126 ± 0.008 ^{aAB}	0.144 ± 0.005 ^{bc}
LFPO-K0	0.147 ± 0.004 ^{bA}	0.165 ± 0.006 ^{bB}	0.210 ± 0.011 ^{bD}	0.232 ± 0.018 ^{bE}	0.195 ± 0.007 ^{cc}
LFPO-K7	0.145 ± 0.004 ^{bA}	0.156 ± 0.010 ^{bA}	0.209 ± 0.003 ^{bB}	0.244 ± 0.014 ^{bc}	0.151 ± 0.006 ^{bA}
LFTO-K0	0.237 ± 0.007 ^{dA}	0.269 ± 0.010 ^{dB}	0.287 ± 0.015 ^{dC}	0.343 ± 0.007 ^{dD}	0.281 ± 0.006 ^{ebC}
LFTO-K7	0.198 ± 0.012 ^{cA}	0.213 ± 0.005 ^{cB}	0.254 ± 0.005 ^{cC}	0.302 ± 0.011 ^{cD}	0.217 ± 0.014 ^{dB}

¹ For sample denomination, see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences (P < 0.05).

against lipid oxidation in oil-in-water emulsions through a combination of free radical scavenging and/or metal chelation (Faraji, McClements, & Decker, 2004).

3.2. Microbiological analysis

Microbial levels of the samples are shown in Table 3. The total viable counts were initially very low and remained low throughout storage (less than 3 log cfu/g) in all samples. The levels of both lactic acid bacteria and *Enterobacteriaceae* were <1 log cfu/g in all samples during storage and remained within the legal limit. There was no clearly identifiable relationship between microbial population and product formulation, as reported previously in this kind of reformulated products (Delgado-Pando et al., 2011a). These results are consistent with the thermal treatment applied (80 °C at the thermal centre) and the storage conditions (in hermetically-sealed containers without air contact at 2 °C), which considerably limit microorganism growth. Similar behaviour has been reported in comparable products, such as liver pâté (Beldarraín, De la Mella, Yáñez, García, & Cepero, 2003; Madden, 1984). No *Enterobacteriaceae* were detected, either initially or throughout storage (28 days) in pâtés formulated with different fat contents (Fernández-López, Sayas-Barberá, Sendra, & Pérez-Álvarez, 2004). The same authors likewise reported total viable aerobic levels similar to those found in the present study, but higher in the case of lactic acid bacteria. This difference could be due to the fact that, unlike the present study, that one was conducted on vacuum-packed pâté slices stored at higher temperatures (4 °C ± 1 °C), which would favour lactic bacteria growth. Madden (1984) also achieved safe storage of vacuum-packed pâté for 6–8 weeks at 2 °C, after heating the pâté to a core temperature of 70 °C.

3.3. Biogenic amines

Biogenic amine contents were affected (P < 0.05) by formulation and storage time (Table 4), with significant interaction between them (P < 0.05). While no detectable concentrations of phenylethylamine or tryptamine were found, initial levels of biogenic amines, especially cadaverine, histamine, spermidine and spermine, were higher than in other meat products such as cooked sausages (frankfurters), or dry-cured

sausages such as chorizo (de las Rivas et al., 2008; Delgado-Pando et al., 2011b). Considering that BA production is related to the growth of microorganisms, chiefly lactic acid bacteria and enterobacterias (Edwards, Dainty, Hibbard, & Ramantanis, 1987); that contents were low (<1 log cfu/g) in both cases; and that moreover BAs are thermally stable, it is obvious that the source of the relatively high initial levels of BAs must have been the meat and non-meat raw materials used to make the products, among them pork liver. Studies have shown the presence in liver of some BAs of physiological interest; however, as far as the authors are aware, there have been no studies on BAs formation in meat raw materials such as pork liver.

Although there were significant variations in the level of biogenic amines as affected by the formulation, in many cases these variations are of little practical importance, whether because the amine concentration is low, the associated changes are slight, or there is no clear connection with the formulation. In the case of histamine, in all the products in which pork backfat was replaced by the healthier lipid combination, initial amine levels were higher (P < 0.05) than in the control pâtés (NFC30 and NFC15) (Table 4). That could be due to the presence of histamine, typically found in fish (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2009), in the fish oil used in the healthier oil combinations. There have been few studies evaluating the effect of konjac or a healthier-lipid combination on BA formation in meat products, and none in the case of pâté-type products; in low-fat dry fermented sausage (chorizo), a direct relationship has been found between the proportion of konjac used (as fat replacer) in the reformulation and the concentrations of putrescine and tyramine in the samples. This was also seen with spermine, while agmatine shows the reverse behaviour (Ruiz-Capillas, Triki, Herrero, & Jiménez-Colmenero, 2011). In low-fat frankfurter manufactured using a healthier oil combination, no clear connection was found between BA and product formulation, although levels of BA formation were very low (Delgado-Pando et al., 2011b).

Changes in BA concentration during storage depended on the type of amine (Table 4), with no clear effect of product composition (formulation). In BAs such as tyramine, histamine and agmatine, although with significant variations over the course of storage, the changes were slight given the levels generally present in foods. In fact, although the most appreciable changes in meat products during storage are typically found in tyramine, in this case tyramine levels remained low (<3 mg/kg) and practically constant throughout storage. This may have to do

Table 3
Total viable counts (log cfu/g) of different pâtés during chill storage.¹

Sample	Storage (days)				
	0	7	20	43	85
NFC30	2.39 ± 0.12 ^{aA}	2.69 ± 0.12 ^{aA}	2.74 ± 0.37 ^{aA}	2.15 ± 0.21 ^{aBA}	2.30 ± 0.00 ^{bA}
LFC15	2.54 ± 0.09 ^{aC}	2.22 ± 0.11 ^{aBC}	2.28 ± 0.00 ^{aBC}	1.81 ± 0.05 ^{aAB}	1.45 ± 0.21 ^{aA}
LFPO-K0	2.19 ± 0.06 ^{aA}	2.48 ± 0.00 ^{aA}	2.65 ± 0.49 ^{aA}	1.99 ± 0.12 ^{aBA}	2.15 ± 0.21 ^{bA}
LFPO-K7	2.30 ± 0.00 ^{aABC}	2.45 ± 0.21 ^{aBC}	2.69 ± 0.86 ^{aC}	1.65 ± 0.07 ^{aA}	1.84 ± 0.09 ^{abAB}
LFTO-K0	1.96 ± 0.17 ^{aAB}	2.48 ± 0.00 ^{aBC}	2.08 ± 0.00 ^{aABC}	2.65 ± 0.07 ^{bc}	1.65 ± 0.07 ^{abA}
LFTO-K7	2.25 ± 0.19 ^{aB}	2.15 ± 0.21 ^{aB}	2.42 ± 0.26 ^{aB}	2.01 ± 0.15 ^{abB}	1.30 ± 0.00 ^{aA}

¹ For sample denomination, see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences (P < 0.05).

Table 4
Biogenic amine levels (mg/kg) of different pâtés during chill storage.¹

Biogenic amines	Sample	Storage (days)				
		0	7	20	43	85
Tyramine	NFC30	1.46 ± 0.11 ^{bB}	2.12 ± 0.45 ^{aD}	1.75 ± 0.18 ^{cC}	1.46 ± 0.06 ^{cB}	0.70 ± 0.08 ^{aA}
	LFC15	1.59 ± 0.10 ^{bA}	2.53 ± 0.13 ^{bC}	2.48 ± 0.03 ^{cC}	1.89 ± 0.07 ^{dB}	1.80 ± 0.11 ^{dAB}
	LFPO-KO	1.10 ± 0.03 ^{aA}	1.95 ± 0.07 ^{aB}	1.16 ± 0.03 ^{aA}	1.02 ± 0.08 ^{abA}	1.21 ± 0.10 ^{bA}
	LFPO-K7	2.19 ± 0.21 ^{cB}	3.05 ± 0.18 ^{cC}	2.18 ± 0.17 ^{dB}	2.16 ± 0.03 ^{cB}	1.32 ± 0.03 ^{bA}
	LFTO-KO	1.53 ± 0.04 ^{bB}	2.03 ± 0.07 ^{aC}	1.50 ± 0.06 ^{bB}	1.17 ± 0.07 ^{bA}	1.33 ± 0.07 ^{bAB}
Histamine	LFTO-K7	1.52 ± 0.08 ^{bB}	1.99 ± 0.07 ^{aC}	1.57 ± 0.18 ^{bcB}	1.01 ± 0.01 ^{aA}	1.49 ± 0.07 ^{cB}
	NFC30	1.80 ± 0.23 ^{aB}	2.01 ± 0.04 ^{aC}	1.21 ± 0.07 ^{aA}	2.28 ± 0.17 ^{abD}	2.11 ± 0.13 ^{bC}
	LFC15	1.66 ± 0.03 ^{aA}	1.93 ± 0.04 ^{aB}	2.29 ± 0.07 ^{cC}	2.46 ± 0.06 ^{bD}	1.86 ± 0.03 ^{bB}
	LFPO-KO	2.09 ± 0.01 ^{bB}	1.94 ± 0.06 ^{aAB}	2.52 ± 0.03 ^{deC}	2.25 ± 0.07 ^{abB}	2.11 ± 0.04 ^{bB}
	LFPO-K7	2.51 ± 0.10 ^{cB}	2.36 ± 0.08 ^{bB}	2.45 ± 0.04 ^{dB}	2.39 ± 0.10 ^{bB}	1.85 ± 0.01 ^{aA}
Putrescine	LFTO-KO	2.25 ± 0.04 ^{bB}	2.30 ± 0.14 ^{bB}	2.03 ± 0.01 ^{bA}	2.09 ± 0.10 ^{aA}	1.84 ± 0.17 ^{aA}
	LFTO-K7	2.41 ± 0.07 ^{bcB}	3.08 ± 0.34 ^{cC}	2.72 ± 0.17 ^{cC}	2.41 ± 0.07 ^{bB}	1.96 ± 0.00 ^{aA}
	NFC30	1.95 ± 0.13 ^{bA}	5.94 ± 0.25 ^{bC}	6.08 ± 0.23 ^{cC}	6.23 ± 0.21 ^{cC}	4.66 ± 0.57 ^{AB}
	LFC15	1.24 ± 0.03 ^{aA}	5.27 ± 0.35 ^{aC}	4.71 ± 0.27 ^{bcC}	4.23 ± 0.13 ^{abB}	5.10 ± 0.51 ^{abC}
	LFPO-KO	1.51 ± 0.01 ^{abA}	5.25 ± 0.38 ^{aB}	4.90 ± 0.06 ^{bB}	4.99 ± 0.30 ^{bB}	6.25 ± 0.44 ^{cC}
Cadaverine	LFPO-K7	1.10 ± 0.14 ^{aA}	5.21 ± 0.44 ^{aC}	4.10 ± 0.03 ^{aB}	5.12 ± 0.14 ^{bcB}	5.35 ± 0.52 ^{bcB}
	LFTO-KO	2.05 ± 0.21 ^{bA}	6.01 ± 0.64 ^{bD}	4.17 ± 0.16 ^{aB}	5.07 ± 0.33 ^{bcB}	6.07 ± 0.47 ^{cdB}
	LFTO-K7	3.57 ± 0.21 ^{cA}	7.46 ± 0.25 ^{cC}	5.99 ± 0.38 ^{CB}	7.50 ± 0.03 ^{dC}	8.54 ± 0.57 ^{dD}
	NFC30	8.98 ± 0.37 ^{bcA}	12.50 ± 1.75 ^{aB}	16.14 ± 0.03 ^{dC}	23.17 ± 1.54 ^{cdD}	21.65 ± 0.16 ^{aD}
	LFC15	7.16 ± 0.34 ^{aA}	16.59 ± 0.41 ^{bC}	12.72 ± 0.93 ^{bbB}	13.78 ± 0.62 ^{aB}	20.83 ± 0.21 ^{aD}
Agmatine	LFPO-KO	6.64 ± 0.25 ^{aA}	17.07 ± 0.49 ^{bD}	11.76 ± 0.68 ^{bbB}	13.78 ± 0.74 ^{aC}	25.87 ± 1.77 ^{beB}
	LFPO-K7	9.94 ± 0.34 ^{cA}	20.25 ± 0.66 ^{cC}	14.51 ± 0.86 ^{cB}	26.51 ± 2.76 ^{ddD}	26.25 ± 0.61 ^{bD}
	LFTO-KO	7.89 ± 0.18 ^{abA}	19.92 ± 0.45 ^{cD}	10.06 ± 0.45 ^{aB}	16.69 ± 0.10 ^{bcB}	25.08 ± 1.05 ^{beB}
	LFTO-K7	10.05 ± 0.18 ^{cbB}	20.21 ± 0.10 ^{cdD}	8.76 ± 0.48 ^{aA}	14.50 ± 0.34 ^{aC}	20.65 ± 1.82 ^{aD}
	NFC30	0.14 ± 0.03 ^{aA}	ND	ND	ND	ND
Spermidine	LFC15	1.67 ± 0.01 ^{ebB}	1.64 ± 0.00 ^{ebB}	1.64 ± 0.08 ^{dB}	1.52 ± 0.00 ^{dAB}	1.42 ± 0.08 ^{cA}
	LFPO-KO	0.40 ± 0.03 ^{bA}	0.31 ± 0.01 ^{aA}	0.37 ± 0.10 ^{aA}	0.38 ± 0.03 ^{aA}	0.46 ± 0.08 ^{aA}
	LFPO-K7	0.98 ± 0.06 ^{dA}	1.01 ± 0.16 ^{cA}	1.12 ± 0.03 ^{bA}	1.02 ± 0.03 ^{bA}	0.84 ± 0.03 ^{bA}
	LFTO-KO	0.58 ± 0.14 ^{cA}	0.60 ± 0.06 ^{bA}	0.49 ± 0.13 ^{aA}	0.47 ± 0.07 ^{aA}	0.49 ± 0.01 ^{aA}
	LFTO-K7	1.68 ± 0.03 ^{ecC}	1.44 ± 0.03 ^{dB}	1.42 ± 0.17 ^{CB}	1.19 ± 0.01 ^{CA}	1.38 ± 0.03 ^{CB}
Spermine	NFC30	6.38 ± 0.37 ^{bA}	12.67 ± 1.34 ^{aC}	13.23 ± 0.92 ^{dC}	13.17 ± 0.58 ^{cC}	10.19 ± 0.21 ^{aB}
	LFC15	5.51 ± 0.35 ^{aA}	12.36 ± 0.42 ^{aD}	11.12 ± 0.20 ^{cC}	9.94 ± 0.20 ^{abB}	10.90 ± 0.28 ^{abC}
	LFPO-KO	5.63 ± 0.13 ^{aA}	12.56 ± 0.11 ^{aC}	10.71 ± 0.16 ^{CB}	11.17 ± 0.47 ^{bbB}	11.73 ± 0.75 ^{bcB}
	LFPO-K7	5.14 ± 0.20 ^{aA}	11.92 ± 0.58 ^{aB}	9.89 ± 0.24 ^{bbB}	11.31 ± 0.33 ^{bbB}	10.48 ± 0.45 ^{abB}
	LFTO-KO	5.49 ± 0.16 ^{aA}	12.95 ± 0.52 ^{aD}	9.10 ± 0.25 ^{abB}	10.85 ± 0.04 ^{bcB}	11.00 ± 0.17 ^{bcB}
Spermine	LFTO-K7	6.24 ± 1.27 ^{abA}	12.20 ± 0.57 ^{aD}	9.63 ± 0.24 ^{abB}	11.40 ± 0.20 ^{bcB}	11.03 ± 0.78 ^{bcC}
	NFC30	38.49 ± 0.16 ^{cA}	59.62 ± 0.40 ^{bcB}	57.17 ± 2.39 ^{dC}	58.92 ± 1.84 ^{cC}	45.09 ± 0.55 ^{aB}
	LFC15	35.42 ± 0.82 ^{bA}	59.92 ± 1.27 ^{bdB}	53.92 ± 0.96 ^{cC}	47.73 ± 0.01 ^{abB}	48.54 ± 3.51 ^{bbB}
	LFPO-KO	34.76 ± 0.14 ^{bA}	59.91 ± 0.30 ^{bcB}	52.16 ± 0.79 ^{CB}	52.90 ± 0.51 ^{bbB}	55.69 ± 2.90 ^{dbB}
	LFPO-K7	31.20 ± 1.13 ^{aA}	55.41 ± 0.52 ^{aD}	46.42 ± 0.17 ^{bbB}	51.41 ± 0.10 ^{bcB}	48.72 ± 1.90 ^{bbC}
	LFTO-KO	34.17 ± 0.01 ^{bA}	60.93 ± 2.05 ^{bdB}	42.33 ± 0.55 ^{aB}	50.86 ± 0.96 ^{bcB}	50.46 ± 1.86 ^{bcC}
	LFTO-K7	39.57 ± 1.71 ^{cA}	55.75 ± 3.27 ^{aD}	45.12 ± 1.41 ^{abB}	51.83 ± 0.66 ^{bcB}	51.56 ± 2.94 ^{ccC}

¹ For sample denomination, see Table 1. Means ± standard deviation. Different letters in the same column (a, b, c, ...) and in the same row (A, B, C, ...) indicate significant differences (P<0.05). ND: not detected.

with the low levels (<1 log cfu/g) of lactic acid bacteria, the main producers of tyramine in vacuum-packed cooked meat products (Bover-Cid et al., 2009; de las Rivas et al., 2008; Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004).

Concentrations of the other BAs (putrescine, cadaverine spermidine and spermine) generally increased (P<0.05) by day 7 of storage, with only slight changes thereafter until the end of the experimental period (Table 4). Putrescine and cadaverine are associated with product spoilage in meat products; however, in this case spoilage was minimal owing to the small microbial load and limited production of amines such as putrescine, levels of which remained below 9 mg/kg. The increase in cadaverine levels, even at a low rate of microbial growth, could be due to differences in the capacity of the microorganisms, chiefly enterobacterias, to produce cadaverine, depending on the species and strain. Formulation, processing conditions and thermal treatment of these meat products could cause the selection of strains that are better able to produce cadaverine despite having similar growth rates. Whereas cadaverine and putrescine levels can reach as high as 40 mg/kg depending on the type of product and the storage conditions in cooked meat products (Cofrades, López-López, Ruiz-Capillas, Triki, & Jiménez-Colmenero, 2011; Delgado-Pando et al., 2011b;

Hernández-Jover, Izquierdo-Pulido, Veciana-Nogues, & Vidal-Carou, 1996; Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2004; Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004), the levels of these amines in fermented products are generally higher, with values ranging between 9 and 800 mg/kg depending on processing and storage conditions (Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2004; Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004; Suzzi & Gardini, 2003). Spermine levels varied over storage but were similar to those found in both meat and fish products (Delgado-Pando et al., 2011a; Ruiz-Capillas, Carballo, & Jiménez-Colmenero, 2007; Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2009). Spermidine and spermine levels in meat products essentially depend on the characteristics of the meat and non-meat raw materials, with ranges of 0.5–10 mg/kg and 15–70 mg/kg respectively (Bover-Cid et al., 2009; Delgado-Pando et al., 2011b; Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2004; Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004). On the basis of BA profiles and contents, consumption of these products clearly does not pose problems of safety. It should be noted in that respect that although cadaverine levels were slightly higher than reported in other cooked products, they were much lower than in fermented or dry-cured products. In any case cadaverine is not itself toxic, but in conjunction with putrescine it enhances the toxicity of histamine. Nevertheless, histamine levels in

these products are very low (<3 mg/100 g), well below the legal limit (50–100 mg/kg), and therefore most unlikely to constitute a hazard to consumers.

4. Conclusions

In addition to the nutritional advantages (fatty acid profile) and good sensory attributes of the n–3 PUFA/konjac gel-enriched low-fat pork liver pâtés (Delgado-Pando et al., 2011a), chill storage did not adversely affect their technological quality (Delgado-Pando et al., 2012) and safety and shelf-life characteristics. Although n–3 PUFA enrichment of low-fat pork liver pâtés favours lipid oxidation, the rate and extent of it are very limited, and so this kind of spoilage is not a problem in the reformulation process. Microbiological population and biogenic amine formation in the pâtés were not related to product formulation, since levels of both were limited, which indicates that consumption of these products does not raise issues of safety.

Acknowledgements

This research was supported by projects AGL2007-61038/ALI and AGL2008-04892-CO3-01 under the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) and the Consolider-Ingenio 2010: CARNISENUSA (CSD2007-00016), Ministerio de Ciencia y Tecnología.

References

- Bailey, M. E., Shi-Lee, S. Y., Dupuy, H. P., St. Angelo, A. J., & Vercellotti, J. R. (1987). Inhibition of warmed-over flavor by Maillard reaction. In A. J. S. Angelo, & M. E. Bailey (Eds.), *Warmed-over-flavor of meat*. Orlando: Academic Press.
- Beldarraín, T., De la Mella, R. M., Yáñez, J., García, A., & Cepero, Y. (2003). Durabilidad de pastas untibles con sabor jamón, hígado y chorizo. *Alimentaria*, 347, 87–90.
- Bhattacharya, M., Hanna, M. A., & Mandigo, R. W. (1988). Lipid oxidation in ground-beef patties as affected by time–temperature and product packaging parameters. *Journal of Food Science*, 53(3), 714–717.
- Bloukas, J. G., Paneras, E. D., & Fournitzis, G. C. (1997). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 45(2), 133–144.
- Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N., et al. (2009). Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1397–1407.
- Cáceres, E., García, M. L., & Selgas, M. D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil – as source of PUFA n–3 – on microstructure and sensory properties of mortadela, a Spanish bologna-type sausage. *Meat Science*, 80(2), 183–193.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat Science*, 87(4), 373–380.
- Cross, H. R., Leu, R., & Miller, M. F. (1987). Scope of warmed-over-flavor and its importance to the meat industry. In A. J. S. Angelo, & M. E. Bailey (Eds.), *Warmed-over-flavor of meat* (pp. 1–18). Orlando: Academic Press.
- D'Arrigo, M., Hoz, L., Cambero, I., López-Bote, C. J., Pin, C., & Ordóñez, J. A. (2004). Production of n–3 fatty acid enriched, pork liver pate. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 37(6), 585–591.
- de las Rivas, B., Ruiz-Capillas, C., Carrascosa, A. V., Curiel, J. A., Jiménez-Colmenero, F., & Munoz, R. (2008). Biogenic amine production by Gram-positive bacteria isolated from Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, 80(2), 272–277.
- Decker, E. A., & Xu, Z. M. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technology*, 52(10), 54–59.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Rodríguez-Salas, L., & Jiménez-Colmenero, F. (2011a). A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Science*, 88(2), 241–248.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011b). Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Science*, 89(1), 65–71.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2012). Low-fat pork liver pâtés enriched with n–3 PUFA/konjac gel: Dynamic rheological properties and technological behaviour during chilling storage. *Meat Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.002>.
- Edwards, R. A., Dainty, R. H., Hibbard, C. M., & Ramantanis, S. V. (1987). Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 63(5), 427–434.
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. *LWT- Food Science and Technology*, 40(1), 58–65.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pate as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92(3), 449–457.
- Faraji, H., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558–4564.
- Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2004). Quality characteristics of ostrich liver pate. *Journal of Food Science*, 69(2), S85–S91.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M. T., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2710–2715.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 567–578.
- Lee, S., Hernández, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., et al. (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n–3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71(3), C233–C238.
- Madden, R. H. (1984). Pork liver pate – Microbiological considerations for small scale production. *Food Trade Review*, 54(11), 604.
- Márquez, E. J., Ahmed, E. M., West, R. L., & Johnson, D. D. (1989). Emulsion stability and sensory quality of beef frankfurters produced at different fat and peanut oil levels. *Journal of Food Science*, 54(867–870), 873.
- Martín, D., Ruiz, J., Kivikari, R., & Puolanne, E. (2008). Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver pates: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. *Meat Science*, 80(2), 496–504.
- Mercadante, A. Z., Capitani, C. D., Decker, E. A., & Castro, I. A. (2010). Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. *Meat Science*, 84(4), 718–726.
- Murphy, A., Kerry, J. P., Buckley, J., & Gray, I. (1998). The antioxidative properties of rosemary oleoresin and inhibition of off-flavours in precooked roast beef slices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2), 235–243.
- Rosmini, M. R., Perlo, F., Pérez-Álvarez, J. A., Pagan-Moreno, M. J., Gago-Gago, A., López-Santovenia, F., et al. (1996). TBA test by an extractive method applied to 'pate'. *Meat Science*, 42(1), 103–110.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science*, 75(3), 397–405.
- Ruiz-Capillas, C., & Jimenez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology*, 218(3), 237–241.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7–8), 489–499.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Biogenic amines in seafood products. In L. M. L. Nollet, & F. Toldra (Eds.), *Handbook of seafood and seafood products analysis* (pp. 833–850). Boca Raton, USA: CRC Press, Member of Francis & Taylor Group.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). New possibilities for fat reduction and improvement of fatty acid content in North African fresh sausage (merguez). *Annals of nutrition and metabolism*, 58 (Suppl. 3), (pp. 127).
- Russell, E. A., Lynch, A., Lynch, P. B., & Kerry, J. P. (2003). Quality and shelf life of duck liver pate as influenced by dietary supplementation with alpha-tocopheryl acetate and various fat sources. *Journal of Food Science*, 68(3), 799–802.
- Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41–54.
- Tang, S., Kerry, J. P., Sheehan, D., Buckley, D. J., & Morrissey, P. A. (2001). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, 34(8), 651–657.
- Triki, M., Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A. M., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Optimisation of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. *Food Chemistry*, 130(4), 1066–1073.
- Tye, R. J. (1991). Konjac flour: Properties and applications. *Food Technology*, 45(3), 82–92.
- Zhang, H., Yoshimura, M., Nishinari, K., Williams, M. A. K., Foster, T. J., & Norton, I. T. (2001). Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights. *Biopolymers*, 59(1), 38–50.

**IV.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL EN HUMANOS DE LOS
PRODUCTOS REFORMULADOS (SALCHICHAS TIPO FRANKFURT Y PATÉS)
CON EL PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO**

IV.2.1. Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk. A placebo-controlled study.

Enviado a European Journal of Nutrition

Effects of improved fat content of frankfurters and pâtés on lipid and lipoprotein profile of volunteers at increased cardiovascular risk. A placebo-controlled study

Gonzalo Delgado-Pando¹, Paloma Celada², Francisco J Sánchez-Muniz², Francisco Jiménez-Colmenero¹, Begoña Olmedilla-Alonso^{1*}

¹*Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC. 28040-Madrid, Spain*

²*Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid*

*Corresponding author: Begoña Olmedilla-Alonso.

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), CSIC. 28040-Madrid, Spain
Phone 91-5492300; FAX 91-54923627; e-mail: Bolmedilla@ictan.csic.es

Short title: Healthier meat products: lipid and lipoprotein changes

Abstract

Purpose

To study the effect of modified frankfurters and pâtés: a) reduced-fat products (RF) (15.3% and 15.2% fat, respectively); b) n-3-enriched reduced-fat products (n-3 RF) (15.1% and 15.5% fat, respectively) and c) normal-fat products (NF) (18% and 30.8% fat, respectively) on lipids, lipoproteins, atherogenic ratios, oxidized LDL and blood pressure of volunteers at high CVD risk.

Methods

Twenty-two volunteers were enrolled in a sequential study of 3 consecutive 4-wk periods separated by 4-wk washout periods.

Results

LDL-cholesterol ($p<0.01$), oxidized LDL, LDL-cholesterol/HDL-cholesterol (both $p<0.05$) were significantly affected by the overall intervention. Compared to baseline, LDL-cholesterol decreased significantly ($p=0.012$) during the RF period; the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio ($p=0.083$) and the diastolic blood pressure ($p=0.067$) also decreased, although non-significantly, after RF consumption. LDL-cholesterol ($p=0.040$) and oxidized LDL ($p=0.016$) increased significantly after NF product consumption; systolic blood pressure ($p=0.098$) increased non-significantly after this period. No significant differences, in absolute or relative changes, were observed between RF and n-3 RF consumption for any parameter tested. However, LDL-cholesterol, oxidized LDL and the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio were lower (12%, 15% and 10%, respectively) after n-3 RF vs NF product consumption. Oxidized LDL was approximately 15% lower after RF vs NF product consumption.

Conclusions

The regular consumption of RF meat products, enriched in n-3 fatty acids or not, positively affects the lipoprotein profile of volunteers, decreasing LDL-cholesterol and oxidized LDL levels and, thus, future risk of cardiovascular accident. On comparison with the effects of NF product intake, the responses to n-3 RF and RF products differ, and while n-3 RF intake induces a reduction of LDL-cholesterol, oxidized LDL-cholesterol and LDL-cholesterol/HDL cholesterol ratio, the intake of RF products modifies only the oxidized LDL level.

Keywords: *reduced fat, omega-3 enriched meat, cholesterol, lipids, lipoprotein, atherogenic ratio, blood pressure, Frankfurters, pâtés.*

Abbreviations: RF, reduced-fat meat; n-3 RF, reduced-fat meat enriched in n-3 fatty acids; LDL, low-density lipoproteins; HDL, high-density lipoproteins; NCD, non-communicable diseases; CHD, coronary heart disease; CVD, cardiovascular disease; PUFA, polyunsaturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids, SFA, saturated fatty acids; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; EFSA, European Food Safety Authority; ALA, α -linolenic acid

INTRODUCTION

Both diet and nutrition play important roles in the development of non-communicable diseases (NCD), responsible for almost two thirds of the mortality worldwide. Thus, cardiovascular diseases (CVD) were responsible for the largest proportion of NCD deaths in individuals under the age of 70 years (39%), followed by cancers (27%) [1]. Unbalanced diet, as well as physical inactivity, smoking habits and harmful use of alcohol, are strongly associated with the development of several NCDs, including CVD [2].

The western dietary pattern, characterized by a high consumption of eggs, meat, fried foods and salty snacks, has been associated with an increased prevalence of coronary heart disease (CHD) all over the world [3]. Epidemiological studies have provided evidence that saturated fat and trans-fat increase the risk of coronary heart disease (CHD) [4-6] and are frequently associated with meat and processed food consumption [7-8]. Saturated fat replacement by polyunsaturated fats or monounsaturated fats seems to reduce the risk, with stronger evidence for the polyunsaturated fats [9-11]. Olive oil is the primary source of fat in the Mediterranean diet, which has gained increasing recognition and worldwide interest as a model for healthful habits [12]. Olive oil consumption decreases low-density lipoprotein- (LDL-) cholesterol when compared to saturated fatty acids (SFA), contains a large amount of antioxidants relative to its polyunsaturated fatty acid (PUFA) content and may slow the development of coronary atherosclerosis [13]. Alpha-linolenic acid (ALA) is the principal fatty acid of linseed oil, a polyunsaturated n-3 essential fatty acid with beneficial effects on cholesterol levels, decreasing both total and LDL cholesterol without affecting high-density lipoprotein- (HDL-) cholesterol [14]. This fatty acid has also been considered an acceptable alternative to fish oils as, once consumed, it can be converted (to a limited extent) into the n-3 PUFA, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids (EPA and DHA, respectively) [10]. These long-chain n-3 PUFA

provide cardioprotective benefits as they have been shown to exert potent antiarrhythmic effects, improve vascular endothelial function and help lower blood pressure, platelet sensitivity and serum triglyceride levels [15]. Based on scientific evidence regarding dietary fat consumption, The European Food Safety Authority (EFSA) considers that SFA and trans SFA intake should be as low as possible and sets adequate intakes for linoleic acid (4% of the energy of the diet), ALA (0.5% of the energy of the diet) and for EPA+DHA (250 mg) [16].

Meat and meat products are an important group of nutritionally dense foods in the diets of many consumers around the world. In 2011, the global meat production was estimated to be 294.7 million tonnes [17], indicating the importance of meat and meat products in the diet. Because of the amount and frequency of consumption, contribution to dietary intakes of different nutrients, diversity of presentations, possibility of modifying their composition using non-meat ingredients, high consumer acceptability, etc., meat and meat products are excellent foods for delivering bioactive compounds without changing dietary habits [18-19]. This has led researchers and the meat industry to modify traditional formulations to make them healthier. There are a number of different strategies to modulate the presence in meat and meat products of numerous compounds (endogenous and exogenous) with different potential effects on the organism. Reformulation of meat products is one of the strategies that has been studied in order to develop meat-based functional foods [20]. This strategy has been used to replace animal fat by a combination of vegetable (olive and linseed) and fish oils and development of two types of healthier meat products with clearly different characteristics: frankfurters and pâtés [21-22]. The resulting pâtés and frankfurters present a balanced lipid profile and can be claimed to be high omega-3 fatty acid products according to a Commission Regulation of the EU [23] and the EFSA [24]. In this study, we have assessed the effect and the potential functionality of these previously developed reduced-fat, n-3-enriched meat products (frankfurters and pâtés) by means of an intervention study in subjects at risk for CVD, evaluating markers and indicators related to CHD.

METHODS AND MATERIALS

Subjects

Twenty-two volunteers were enrolled in a crossover study and 21 completed the study. Participants were selected from approximately 48 subjects who were interested and contacted through advertisements in different universities, research centers and several noticeboards. The selected subjects fulfilled the inclusion criteria: total cholesterol levels > 200 mg/dl, LDL cholesterol levels > 110 mg/dl, overweight (BMI > 25 and < 34.9 kg/m²) and willingness to consume 200 g of frankfurters and 250 g of pâté per week. The exclusion criteria were: use of drugs or phytosterol-enriched beverages/foods to control cholesterol levels, hypertension or obesity, regular consumption of n-3 enriched food products, intolerance or food allergy to any of the components of the meat products.

They were also instructed to maintain a mixed diet (no avoidance of any food groups) and to replace the helpings of meat and meat products of their habitual diet with helpings of the provided meat products. The characteristics of the subjects of the intervention study are shown in **Table 1**.

The study was approved by the Ethical Committee for Clinical Investigation of Hospital Universitario Puerta de Hierro-Madajahonda (Acta nº 261, dated 20/ 12/ 2010) and the Bioethical Committee of the Spanish National Research Council. All subjects gave their written informed consent after receiving oral and written information about the study.

Meat products

Frankfurters and pâtés were developed in the pilot plant of the Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN, CSIC). Three different batches were produced, a) reduced-fat products (RF) (15% fat), b) reduced-fat (15% fat) n-3-enriched meat products (n-3 RF) in which the animal fat source (pork backfat) was replaced by a combination of olive, linseed and fish oil [21-22], and c) normal-fat control products (NF) (18% fat for frankfurters, 30% fat for pâtés). This oil combination was used as an ingredient in the form of an oil-in-water emulsion, composed of olive, linseed and fish oil (44.39%, 37.87% and 17.74%, respectively).

RF frankfurters and pâtés were reformulated by reducing their fat content, and n-3 RF products by reducing their fat content and replacing the pork backfat with the oil combination mentioned above, yielding meat products with an improved lipid profile [21-22]. The NF products were similar (in fat content) to those usually found in the

market. Additionally, the technological, sensorial and microbiological viability of these products has been established [21-22,25]. In this study, some slight composition modifications have been introduced in the frankfurter development in order to achieve the established fat levels. The nutrient profiles of the different pâtés and frankfurters of the study are shown in **Table 2**.

Containers of 250 g of pâté and 200 g of vacuum-packed frankfurters were prepared. At the beginning of every intervention period, the meat products were delivered and volunteers were instructed to store them under refrigeration until consumption. Frankfurters and pâtés were ready for consumption. Once open, the containers had to be consumed within a 1-week period.

Study Design

The study was a non-randomized, controlled, crossover design of 5 months' duration. The non-randomization was due to limitations in the production of the meat products in the pilot plant. Subjects consumed 800 g of frankfurters and 1 kg of pâtés during each of the three 4-week study phases (200 g of frankfurters and 250 g of pâtés per week), followed by a four-week washout interval. Every period lasted long enough to produce significant changes in the lipid profile and the lipoprotein levels [26], as well as to return to the baseline lipid profile after the washout periods [27,20]. During the washout periods the subjects followed their habitual diets, making it possible to compare the effect of the “healthier” meat product consumption against their habitual diets, thus proving the effectiveness of the regular consumption of these kinds of products [28].

The outline of the study was as follows: first phase, volunteers consumed RF products in which the fat source was 100% animal fat; second phase, n-3 RF products were consumed; third phase, NF frankfurters and pâtés were consumed.

Subjects completed 3-d dietary records at the beginning of each period in order to analyze their diets and to confirm the substitution of the meat products in their ordinary meals. Complete analyses of the dietary records will be reported in another paper.

During the second intervention period, the volunteers consumed 450 g of n-3 RF frankfurters and pâtés, which provided 2 g of n-3 fatty acids per day, 1.5 g of which were ALA and approximately 0.4 g, EPA + DHA.

During each visit, blood samples and dietary records were collected and subjects given a new batch of meat products, when necessary, and a diet record. Overnight fasting blood samples were collected at the start and end of each period from all participants. Serum was separated from blood by centrifugation at 2,500 g x 15 min and kept frozen at -80°C until analysis.

Serum cholesterol (total, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol), oxidized LDL and triglycerides were measured as CHD biomarkers to assess the impact of the regular consumption of different NF, RF and n-3 RF frankfurters and pâtés.

Analytical Methods

All the blood samples from each volunteer were analyzed on the same day in order to minimize the analytical variability associated with different days.

LDL- and HDL- cholesterol were assessed with an enzymatic colorimetric procedure (BioSystems LDL and HDL Direct). Total cholesterol and triglyceride concentrations were also assessed by enzymatic colorimetric kit (BioSystems Cholesterol and BioSystems Triglycerides Glycerol phosphate oxidase/peroxidase, respectively). Serum oxidized LDL level was quantified by an ELISA system (Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

The interassay and intraassay coefficients of variation (CV) for total, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were 1.9%, 2.0%, 1.3% and 2.6%, and 1.1%, 0.7%, 0.8% and 1.7%, respectively.

Different indexes were also calculated as CHD-biomarkers: the Atherogenicity Index (total cholesterol/HDL-cholesterol) as proposed by Castelli [29], the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio, and the atherogenicity of LDL, calculated by the molar ratio of triglycerides to HDL cholesterol.

Statistical Analysis

Sample size calculation was performed on the basis of a mean value for baseline LDL-cholesterol of 140 mg/dl. A sample size of 22 subjects (SD=16) is necessary to obtain a 10% difference in LDL-cholesterol (14 mg/dl) with 80% power and an alpha error of 0.05. Results are expressed as mean \pm SD. All data had normal distribution, assessed using a normal probability plot and the Kolmogorov-Smirnov test. There were no statistical differences ($p>0.05$) between the mean baseline levels in any the three

phases of the study (general linear model, GLM, repeated measures); therefore, the baseline value for each parameter was the mean of the three samples from each volunteer collected at the beginning of each period in the intervention study. Student's t test for paired data was used to assess the significance of changes in each period compared to baseline. In addition, a GLM (repeated measures) followed by the Bonferroni test was employed to assess the statistical differences between periods for each parameter in terms of relative percent changes. Chi square test was used to assess changes in prevalences of individuals with altered lipid, lipoprotein and blood pressure levels. All the statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA).

RESULTS

Baseline levels at the initiation of the first intervention period of the study are shown in Table 1. The subjects had high total and LDL-cholesterol levels and an average BMI of 28.8 kg/m². The volunteers showed no hypertension or high fasting blood glucose levels.

Table 2 shows some nutritional information on the frankfurters and pâtés used in the intervention study. RF and NF products differ mainly in the fat quantity, with the energy content in the RF products reduced by nearly 30%. n-3 RF products showed a different lipid profile, providing higher PUFA and lower SFA percentages. According to our dietary records, frankfurters and pâtés prepared for the study were adequately introduced into the habitual diets of the subjects (unpublished data).

Table 3 shows the intake effect of the frankfurters and pâtés (RF, n-3 RF and NF) on lipids, lipoprotein, CVD risk factors and blood pressure, LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio, and blood pressure. On comparing blood lipid concentrations after the diet with n-3 RF products with baseline, there was a decrease in the LDL-cholesterol level (7 mg/dl), with no variation of the oxidized LDL; by contrast, blood lipids underwent no variation after the first period, in which the RF products were consumed. When the NF frankfurters and pâtés (similar to commercial products) were consumed, LDL-cholesterol and oxidized LDL levels increased (8.4 mg/dl and 7.5 U/l, respectively). On analyzing the aforementioned indexes and ratios, no differences were found after the intervention in any of the three phases. However, the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio was reduced (0.14) by the consumption of n-3 RF

meat products ($p<0.1$). Regarding blood pressure, systolic pressure was increased (3.1 mmHg, $p>0.1$) in the third period (after NF product intake), while diastolic pressure decreased (2.4 mmHg) in the second period (after consumption of n-3 RF products).

No statistical differences were found between the first and the second periods (RF vs n-3 RF) in any of the parameters measured; however, significant differences were observed between the second and third phases (n-3 RF vs NF) (**Fig 1a**) and between the first and third phases (RF vs NF). Comparing the n-3 RF frankfurters and pâtés consumption period with the NF consumption period, significant ($p<0.01$) reductions were observed in LDL-cholesterol (11.8%), oxidized LDL (17.3%) and the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio (10.8%, $p<0.05$) (**Fig 1b**). Comparing the RF product consumption phase with the NF phase, there was a significant reduction (14.5%) in the oxidized LDL level (**Fig 1c**).

DISCUSSION

Most studies of diet and CVD have focused on dietary lipids. Until very recently, public health recommendations have been concentrated on limiting the intake of total dietary fat. Based on the most recent evidence, the recommendations for CVD risk reduction are now focused, among other major points, on the reduction of saturated fat intake [16,30]. However, meat products are a great source of SFA and limiting their fat content does produce important changes in blood lipids [31-33]. In the present study, we addressed the question of whether the consumption of RF n-3-enriched frankfurters and pâtés could produce changes in blood lipids and different markers of CVD. We also wanted to assess the benefits of the consumption of these n-3-enriched products versus RF meat products, and draw a comparison with the consumption of non-modified frankfurters and pâtés (with compositions similar to commercial ones), in terms of CVD risk markers. RF frankfurters and pâtés were produced by decreasing the quantity of fat (pork backfat as main fat source) used in the manufacture of the meat products. As mentioned above, for n-3 RF frankfurters and pâtés, an oil-in-water emulsion was prepared as fat source. These oils were selected, among other reasons, to produce frankfurters and pâtés with a fatty acid composition in line with health recommendations; we wanted to reduce the SFA levels of these products by increasing their total PUFA and n-3 PUFA contents, with slight modifications in their monounsaturated fatty acid (MUFA) content (as recommended by the EFSA [16]), but

we also wanted to obtain stabilized products and with sensory acceptance among consumers. Olive oil is very rich in MUFA and has a high biological value, attributed to a high ratio of vitamin E to PUFA. It has a lower ratio of SFA/MUFA than any other vegetable oil and contains antioxidant substances in optimum concentrations [34]; therefore, it was the main oil (44.39%) of the emulsion. To increase the PUFA content we selected linseed oil (37.87%) (with low levels of SFA [14]), which provides a great amount of the n-3 PUFA, ALA, and we also used fish oil (17.74%) for its content in the long-chain n-3 PUFA, EPA and DHA, to achieve an adequate intake of n-3 fatty acids. Nutritional recommendations for n-3 fatty acids are estimated to be between 1.4 - 3 g/day [24,35-36], while the recommendations for long-chain n-3 PUFA range between 180-1000 mg/day [24,16,35]. The n-3 RF products were consumed during the second phase of the study, providing 0.43 g of EPA+DHA per day, almost the 500 mg/day recommended by the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL) [37], and fulfilling the adequate intake established by the EFSA (250 mg) [16]. Considering an average energy intake of 2000 kcal, ALA provided 0.78% of the energy through the consumption of the frankfurters and pâtés during the second phase of the intervention study. The adequate ALA intake established by the EFSA is 0.5% of the energy of the diet [16].

In the present study, the consumption of the reformulated frankfurters and pâtés (RF and n-3 RF) over four weeks provoked a reduction of 5.4% in the LDL-cholesterol level, with no other significant changes in total or HDL-cholesterol. Due to the mixture of oils used as the main fat source in the reformulated frankfurters and pâtés, it is difficult to attribute the changes in blood lipids to any of the vegetable and marine oils. Similar results were observed after the consumption over four weeks of n-3 and oleic acid-enriched milk, with levels of oleic acid and EPA+DHA similar to those of reformulated meat products; there were no significant changes in total and HDL-cholesterol, and a reduction of LDL-cholesterol (9.4%) was observed [38]. Therefore, the combination of oleic acid and long-chain n-3 PUFA's could be the main cause of the effect on blood lipids. Reduced-fat n-3-enriched frankfurters and pâtés had a great amount of ALA, which could also affect blood lipid concentration, but a systematic review of 14 studies (with a minimum of four weeks' duration) concluded that ALA consumption did not significantly modify blood lipids [39]. In contrast, a recent meta-analysis evaluating the effects of EPA and DHA on blood lipids found that, compared

with placebo, DHA significantly raised LDL-cholesterol (7.23 mg/dl) and HDL-cholesterol (4.49 mg/dl), whereas EPA non-significantly reduced LDL- and increased HDL-cholesterol levels [40]. Evaluating the effect of fish oil consumption on blood lipids, a meta-analysis concluded that fish oil consumption produced no significant changes in total cholesterol, but did produce a small increase in HDL- and LDL-cholesterol (1.6 mg/dl and 6 mg/dl, respectively) [41].

Although there is not enough evidence to support the role of n-3 fatty acid consumption in the changes produced in lipoproteins, studies indicate that the use of fish oil is associated with coronary heart disease risk reduction, one of the mechanisms responsible for this is the reduction of triglyceride levels, accomplished by decreasing the production of hepatic triglycerides and increasing the clearance of plasma triglycerides [42]. The evidence also supports a dose-dependent beneficial effect of fish oil on serum triglycerides, particularly among people with more elevated levels [41], with both EPA and DHA reducing triglyceride levels (DHA more markedly than EPA) [40]. In the present study, no significant modification of serum triglyceride levels was observed after the consumption of n-3 RF products. This circumstance could be related to the low baseline levels of serum triglycerides (125 mg/dl) and also to the wide variability of this parameter among volunteers. Other constituents of the reformulated frankfurters and pâtés might also have a role in this finding. There were no significant changes in triglyceride levels after the consumption of RF or NF frankfurters and pâtés when compared with the other periods of the study. After NF and RF product consumption, a slight decrease in triglyceride levels was observed, whereas the consumption of n-3 RF products produced a slight non-significant increase. Therefore, the oil mixture composition (fat source of n-3 RF products) may be one of the factors responsible for this effect on triglyceride levels, as n-3 fatty acids are known to decrease serum triglycerides [42-43].

In the third period of the study, after the NF product consumption, LDL-cholesterol and oxidized LDL levels increased by 6.4% and 7.5%, respectively. Accordingly, consumption of NF frankfurters and pâtés similar to commercial ones produced an increase in the risk of CVD by increasing LDL-cholesterol and oxidized LDL levels, while a consumption of RF frankfurters and pâtés avoided this effect. The latter effect may be attributable first to the amounts of fat and SFA in the meat products

consumed. The substitution of oleic acid by palm olein (8% E) induced an increase in LDL-cholesterol in postmenopausal women [44].

A better approximation to the effects of the three different frankfurters and pâtés can be achieved by comparing their relative changes (Fig 1) n-3 RF product intake decreased total, LDL- and HDL-cholesterol when compared with NF products (0.5%, 11.8%, 2.1%, respectively), although significant effects were found only in LDL-cholesterol. Similarly, after 4 weeks of dietary intervention, a 7.8% reduction of LDL-cholesterol was observed after replacing 40% of the fat in the background diet with virgin olive oil [45]. The consumption over four weeks of rapeseed oil (rich in ALA) produced a significant reduction in total and LDL-cholesterol when compared with a diet rich in SFA [46]. The bulk of the evidence shows that substitution of SFA by either MUFA or PUFA leads to reductions in total and LDL-cholesterol [47]. But there is considerable evidence to show that a PUFA diet increases the oxidative susceptibility of LDL, compared to a MUFA-enriched diet, due to the greater degree of unsaturation present in PUFA [10]. Our group found that a substitution of MUFA by SFA (approx 8% E) significantly increased LDL-cholesterol but decreased serum and LDL oxidation [44]. Oxidized LDL has been found to correlate with the extent of CHD and to be an independent predictor of an atherosclerotic plaque occurrence; thus, elevated levels of oxidized LDL might be used as an early indicator of CVD [48]. In the present study, n-3 RF and RF decreased 17.3% and 14.5%, respectively, in comparison with NF products; the oxidizability of LDL suggests that a regular consumption of both RF products could be effective in reducing the atherogenicity of LDL. Olive oil contains hydroxytyrosol and other potent antioxidants [49] that have been proven to decrease oxidation in LDL [50]. A reduction of oxidized LDL of 16% was found after a six-week consumption of turnip rapeseed oil (rich in MUFA and PUFA) in men with metabolic syndrome [48]. Thus, a “good” mixture of fatty acids or a reduction of animal fat could lead to protection against the oxidation of the LDL molecules. The changes in the oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio were non-significant (Table 3), but after the consumption of NF products, the ratio tended to increase slightly (from 0.42 to 0.45).

Although total, HDL- and LDL-cholesterol levels were non-significantly lowered by consuming RF products (in comparison with NF products), there was a decrease ($p<0.05$) in the oxidized LDL levels.

Surprisingly, no significant differences were found when comparing the consumption of RF and n-3 RF frankfurters and pâtés (in terms of relative changes; see Figure 1). But downward trends were observed in LDL cholesterol (4.7%) and oxidized LDL (2.8%). In addition, the comparison of RF versus NF product consumption led to non-significant reductions in total, HDL- and LDL-cholesterol (1.6%, 7.1%, 2.2%, respectively). These results are in agreement with those reported in other studies [33,51].

Epidemiological and clinical studies have clearly suggested that cholesterol levels do not provide incremental predictive value over cholesterol ratios in identifying people at risk for CHD [52]. Nowadays, different ratios of lipid fractions are being used as predictors or as indicators of CHD risk reduction. Total cholesterol/HDL-cholesterol, LDL-cholesterol/HDL-cholesterol and the molar triglyceride/HDL-cholesterol ratios are widely used. This study suggests that the consumption of n-3 RF frankfurters and pâtés in place of NF products can reduce CVD risk as they significantly reduced the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio.

In the present study, the subjects lowered their high CVD risk by reducing their LDL-cholesterol level below 130 mg/dl (high risk factor for CVD [53]). Almost 67% of the subjects had LDL-cholesterol levels above 130 mg/dl, but after consumption of the n-3 RF products, the percentage decreased to 38% ($p=0.064$).

Blood pressure is a major risk factor for CVD [54]. Slight, non-significant variations were observed after the consumption of the different meat products. Due to safety regulations, industrial meat products normally contain relatively high amounts of NaCl. All the meat products described here contained 2g NaCl/100 g (approximately 950 mg Na/100 g [55]), similar to commercial frankfurters and pâtés, but lower than other meat products like cured ham. The apparent refractoriness of normotensive individuals in terms of decreasing their blood pressure has been reported in several studies [56-57]. Moderate NaCl restriction induced only negligible blood pressure reduction in normotensive individuals [56]. In our study, blood pressure levels generally remained below 140/90 mm Hg, cut-off point for defining hypertension [58].

In summary, we can conclude that, in comparison to consumption of NF meat products, the regular intake of n-3-enriched RF frankfurters and pâtés does decrease the LDL-cholesterol and oxidized LDL levels, as well as the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio. The consumption of any of the meat products in the study did not

provoke any significant increase in the total cholesterol or blood pressure. The development and consumption of RF meat products, enriched or not in n-3 PUFA, appears to be a suitable strategy to decrease CVD risk in meat consumers, although the intake effects of n-3 RF and RF products differ, and while n-3 RF intake induces a reduction in LDL-cholesterol, oxidized LDL-cholesterol and LDL-cholesterol/HDL cholesterol ratio, the intake of RF products modifies only the oxidized LDL level.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by project AGL2008-04892- CO3-01 of the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) and the Consolider-Ingenio 2010:CARNISENUSA (CSD2007-00016), Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

REFERENCES

1. WHO (2011) Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization, Geneva (Switzerland)
2. WHO (2009) Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. World Health Organization, Geneva (Switzerland)
3. IOM (ed) (2010) Promoting cardiovascular health in the developing world. A critical challenge to achieve global health. The National Academies Press, Washington, D.C.
4. Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Giaipauli S, Jansen A, Karvonen M, Katan M, Nissinen A, Nedeljkovic S, Pekkanen J, Pekkarinen M, Punsar S, Rasanen L, Simic B, Toshima H (1995) Dietary saturated and trans-fatty-acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 24 (3):308-315
5. Hu FB, Manson JE, Willett WC (2001) Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *J Am Coll Nutr* 20 (1):5-19
6. Pedersen JI, James PT, Brouwer IA, Clarke R, Elmadfa I, Katan MB, Kris-Etherton PM, Kromhout D, Margetts BM, Mensink RP, Norum KR, Rayner M, Uusitupa M (2011) The importance of reducing SFA to limit CHD. *Br J Nutr* 106 (7):961-963
7. WHO (2003) Diet, Nutrition and the Prevention of chronic diseases. Technical Report Series. Geneva (Switzerland)

8. Sinha R, Cross AJ, Graubard BI, Leitzmann MF, Schatzkin A (2009) Meat Intake and Mortality A Prospective Study of Over Half a Million People. *Arch Intern Med* 169 (6):562-571
9. Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, Hermansen K, Hu FB, Jakobsen MU, Kok FJ, Krauss RM, Lecerf JM, LeGrand P, Nestel P, Riserus U, Sanders T, Sinclair A, Stender S, Tholstrup T, Willett WC (2011) The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr* 93 (4):684-688
10. Bhupathiraju SN, Tucker KL (2011) Coronary heart disease prevention: Nutrients, foods, and dietary patterns. *Clin Chim Acta* 412 (17-18):1493-1514
11. Jakobsen MU, O'Reilly EJ, Heitmann BL, Pereira MA, Balter K, Fraser GE, Goldbourt U, Hallmans G, Knekt P, Liu S, Pietinen P, Spiegelman D, Stevens J, Virtamo J, Willett WC, Ascherio A (2009) Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Clin Nutr* 89 (5):1425-1432
12. Piscopo S (2009) The Mediterranean diet as a nutrition education, health promotion and disease prevention tool. *Public Health Nutr* 12 (9A):1648-1655
13. Ruiz-Canela M, Martinez-Gonzalez MA (2011) Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas* 68 (3):245-250
14. Lunn J, Theobald HE (2006) The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr Bull* 31 (3):178-224
15. Wijendran V, Hayes KC (2004) Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr* 24:597-615
16. EFSA (2010) Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* 8 (3):1461
17. FAO (2011) Food Outlook. Global Market Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (Italy)
18. Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I (2006) Nutritional approach for designing meat-based functional food products with nuts. *Crit Rev Food Sci* 46 (7):537-542
19. Canales A, Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Corella D, Guillen M, Benedi J (2011) Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM,

ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *Eur J Clin Nutr* 65 (6):703-710

20. Jiménez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B, Collaborators (2010) Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem* 123 (4):959-967

21. Delgado-Pando G, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Jimenez-Colmenero F (2010) Healthier lipid combination as functional ingredient influencing sensory and technological properties of low-fat frankfurters. *Eur J Lipid Sci Technol* 112 (8):859-870

22. Delgado-Pando G, Cofrades S, Rodríguez-Salas L, Jiménez-Colmenero F (2011) A healthier oil combination and konjac gel as functional ingredients in low-fat pork liver pâté. *Meat Sci* 88 (2):241-248

23. Commission Regulation (EU) No 116/2010 of 9 February 2010 amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims. *Of J Eur Union* 2010, L37, 18.

24. EFSA (2005) Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat. *EFSA J* 253:1-29

25. Delgado-Pando G, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Solas MT, Triki M, Jiménez-Colmenero F (2011) Low-fat frankfurters formulated with a healthier lipid combination as functional ingredient: Microstructure, lipid oxidation, nitrite content, microbiological changes and biogenic amine formation. *Meat Sci* 89 (1):65-71

26. Oubiña P, Sanchez-Muniz FJ, Rodenas S, Cuesta C (2001) Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *Brit J Nutr* 85 (1):41-47

27. Becker CC, Lund P, Holmer G, Jensen H, Sandstrom B (1999) Effects of butter oil blends with increased concentrations of stearic, oleic and linolenic acid on blood lipids in young adults. *Eur J Clin Nutr* 53 (7):535-541

28. Aggett PJ, Antoine JM, Asp NG, Bellisle F, Contor L, Cummings JH, Howlett J, Muller DJG, Persin C, Pijls LTJ, Rechkemmer G, Tuijelaars S, Verhagen H (2005) PASSCLAIM - Consensus on criteria. *Eur J Nutr* 44:5-30

29. Castelli WP (1988) Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. 4 Suppl A:5A-10A
30. Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M, Wylie-Rosett J (2006) Diet and lifestyle recommendations revision 2006 - A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee (vol 114, pg 82, 2006). *Circulation* 114 (1):82-+
31. Li D, Siriamornpun S, Wahlqvist ML, Mann NJ, Sinclair AJ (2005) Lean meat and heart health. *Asian Pac J Clin Nutr* 14 (2):113-119
32. Morgan SA, Sinclair AJ, Odea K (1993) Effect on serum lipids of addition of safflower oil or olive oil to very-low-fat diets rich in lean beef. *J Am Diet Assoc* 93 (6):644-648
33. Petzke KJ, Lemke S, Klaus S (2011) Increased fat-free body mass and no adverse effects on blood lipid concentrations 4 weeks after additional meat consumption in comparison with an exclusion of meat in the diet of young healthy women. *J Nutr Metab* 2011:210930
34. Bloukas JG, Paneras ED, Fournitzis GC (1997) Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Sci* 45 (2):133-144
35. Garg ML, Wood LG, Singh H, Moughan PJ (2006) Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *J Food Sci* 71:R66-R71
36. Kolanowski W, Swiderski F, Berger S (1999) Possibilities of fish oil application for food products enrichment with ω -3 PUFA. *Int J Food Sci Nutr* 50:39-49
37. Kris-Etherton PM, Grieger JA, Etherton TD (2009) Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostag Leukotr Ess* 81 (2-3):99-104
38. Baró L, Fonolla J, Peña JL, Martínez-Férez A, Lucena A, Jiménez J, Boza JJ, López-Huertas E (2003) n-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr* 22 (2):175-182
39. Wendland E, Farmer A, Glasziou P, Neil A (2006) Effect of alpha linolenic acid on cardiovascular risk markers: a systematic review. 92 (2):166-169

40. Wei M, Jacobson T (2011) Effects of Eicosapentaenoic Acid Versus Docosahexaenoic Acid on Serum Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Atheroscler Rep* 13 (6):474-483
41. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J (2006) Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis* 189 (1):19-30
42. Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ (2008) Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 197 (1):12-24
43. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, Nutrition C (2002) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106 (21):2747-2757
44. Cuesta C, Rodenas S, Merinero MC, Rodriguez-Gil S, Sanchez-Muniz F (1998) Lipoprotein profiles and serum peroxide levels of aged women consuming palmolein or oleic acid-rich sunflower oil diets. *Eur J Clin Nutr* 52 (9):675-683
45. Damasceno NR, Perez-Heras A, Serra M, Cofan M, Sala-Vila A, Salas-Salvado J, Ros E (2011) Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21 Suppl 1:S14-20
46. Södergren E, Gustafsson IB, Basu S, Nourooz-Zadeh J, Nälsen C, Turpeinen A, Berglund L, Vessby B (2001) A diet containing rapeseed oil-based fats does not increase lipid peroxidation in humans when compared to a diet rich in saturated fatty acids. *Eur J Clin Nutr* 55 (11):922-931
47. Mensink RP, Katan MB (1992) Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A metaanalysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 12 (8):911-919
48. Palomaki A, Pohjantahti-Maaroos H, Wallenius M, Kankkunen P, Aro H, Husgafvel S, Pihlava J-M, Oksanen K (2010) Effects of dietary cold-pressed turnip rapeseed oil and butter on serum lipids, oxidized LDL and arterial elasticity in men with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis* 9:137
49. Sánchez-Muniz F (2007) Aceite de oliva, clave de vida en la cuenca mediterránea. *An R Acad Nac Farm* 73:653-692
50. Vázquez-Velasco M, Esperanza Díaz L, Lucas R, Gómez-Martínez S, Bastida S, Marcos A, Sánchez-Muniz FJ (2011) Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *105 (10):1448-1452*

51. Odea K, Traianedes K, Chisholm K, Leyden H, Sinclair AJ (1990) Cholesterol lowering effect of a low-fat diet containing lean beef is reversed by the addition of beef fat. *Am J Clin Nutr* 52 (3):491-494
52. Natarajan S, Glick H, Criqui M, Horowitz D, Lipsitz SR, Kinosian B (2003) Cholesterol measures to identify and treat individuals at risk for coronary heart disease. *Am J Prev Med* 25 (1):50-57
53. NHLBI (May 2001) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Executive Summary. NIH Publication No. 01-3670. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI), USA
54. Kannel WB, Gordon T, Schwartz MJ (1971) Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease-Framingham study. *Am J Cardiol* 27 (4):335-&
55. López-López I, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F (2009) Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat Sci* 83 (2):255-262
56. Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, Evans A, Ferrario M, Tuomilehto J, Project WM (2000) Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 355 (9205):675-687
57. Sánchez-Muniz FJ (2012) Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hospit* 27 (1):31-45
58. Whitworth JA (2003) 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21 (11):1983-1992

Table 1. Baseline characteristics of the volunteers (n=22, 18 men and 4 women) at the start of the intervention study (Mean \pm SD)

	Baseline levels
Age (years)	43.9 \pm 12.0
Body mass index (kg/m ²)	28.8 \pm 2.8
Total cholesterol (mg/dl)	233.3 \pm 23.6
HDL-cholesterol (mg/dl)	47.1 \pm 9.0
LDL-cholesterol (mg/dl)	134.2 \pm 23.7
Triglycerides (mg/dl)	125.3 \pm 70.9
Blood glucose (mg/dl)	91.3 \pm 16.6
Systolic blood pressure (mm Hg)	121.1 \pm 10.7
Diastolic blood pressure (mm Hg)	76.1 \pm 10.2
Smoking habit ^a	15 non-smokers/7 smokers
Alcohol consumption	8 never/12 sometimes /2 regularly

^aSmokers: 10-20 cigarettes/day

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; SD, standard deviation.

Table 2. Nutrient and lipid profile of the different frankfurters and pâtés consumed in the study

	Reduced-fat products		n-3-enriched reduced-fat products		Normal-fat products	
	Frankfurter	Pâté	Frankfurter	Pâté	Frankfurter	Pâté
Protein (g/100g)	17.9	13.3	19.4	14.2	18.3	13.2
Fat (g/100g)	15.3	15.2	15.1	15.5	18.0	30.8
% of total fatty acids						
SFA	39.4	32.3	19.3	21.3	39.4	32.3
Palmitic acid	23.4	20.5	11.4	13.6	23.4	20.5
Stearic acid	13.8	9.9	5.4	6.0	13.8	9.9
MUFA	49.5	58.3	46.9	42.5	49.5	58.3
Oleic acid	42.5	50.5	42.5	37.4	42.5	50.5
PUFA	10.6	9.0	33.6	35.6	10.6	9.0
Linoleic acid	8.6	7.4	10.8	11.6	8.6	7.4
Linolenic acid	0.6	0.5	17.7	17.5	0.6	0.5
EPA	-	-	2.6	2.7	-	-
DHA	-	-	1.7	1.8	-	-
Total omega-3 fatty acids (g/100g)	0.2	0.2	3.4	3.7	0.2	0.2
Moisture (g/100g)	58.8	65.7	57.8	64.1	55.7	50.1
Energy (kcal/100g)	212.6	203.4	216.9	211.8	238.8	345.5

Data partially adapted from [21] and [22]. SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid.

Table 3. Serum concentrations of lipids, HDL- and LDL-cholesterol and oxidized LDL, diverse atherogenic indexes, and blood pressure of volunteers in the different intervention periods

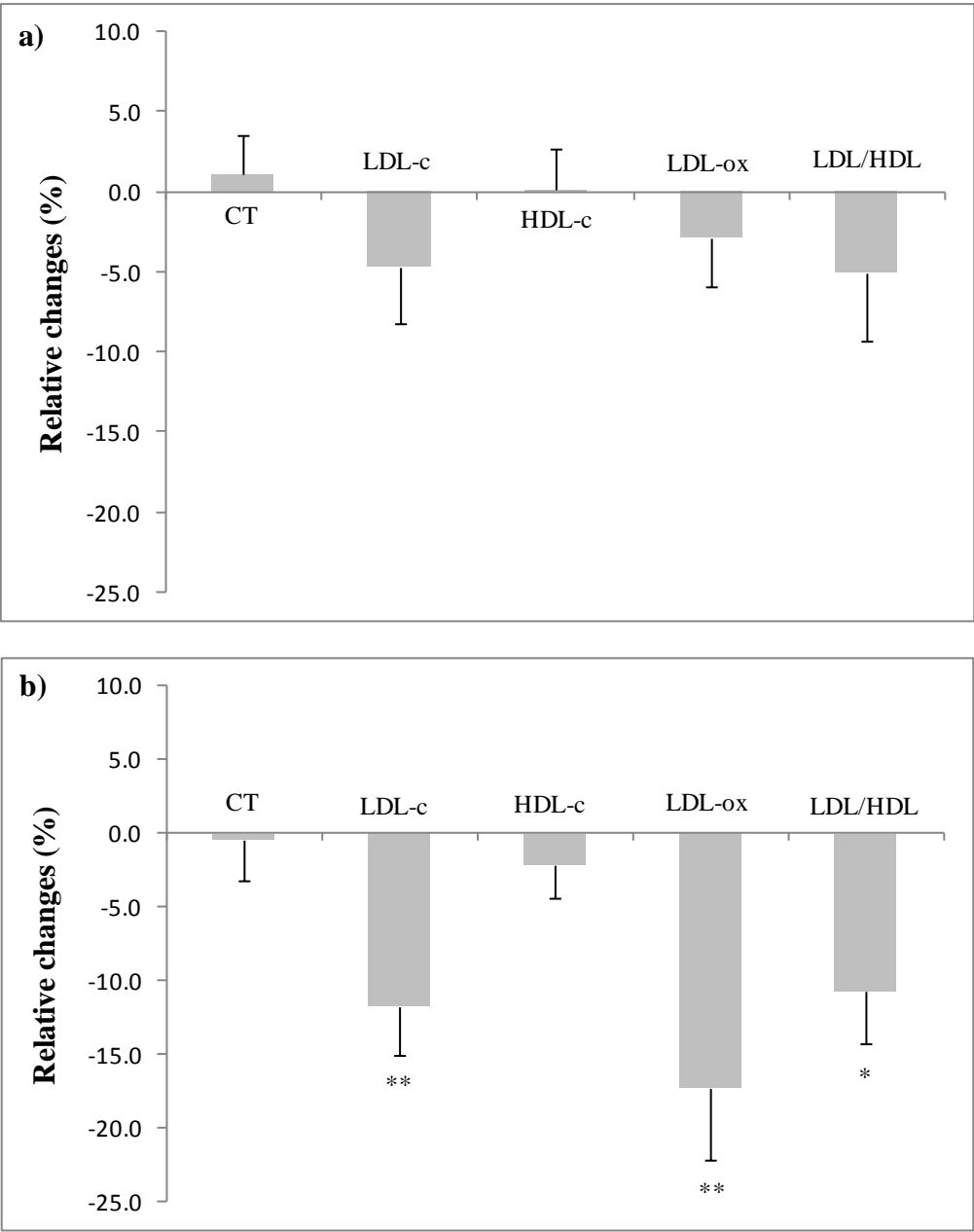
	Baseline	Final concentrations (Reduced-fat products)	Final concentrations (n-3-enriched reduced-fat products)	Final concentrations (normal-fat products)	Statistical significance (GLM, repeated measures)
Total cholesterol (mg/dl)	232.4 ± 20.7	232.5 ± 20.4 ^a	235.6 ± 30.3 ^a	236.7 ± 26.5 ^a	p = 0.656
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		0.1 (-6.3, 6.5) p=0.978	3.3 (-5.9, 12.4), p=0.463	4.4 (-2.3, 11.0) p=0.188	
HDL-cholesterol (mg/dl)	47.7 ± 7.8	47.9 ± 9.7 ^a	47.8 ± 8.9 ^a	48.9 ± 10.9 ^a	p = 0.633
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		0.2 (-1.7, 2.0) p=0.870	0.1 (-1.7, 1.9) p=0.924	1.2 (-1.5, 3.9) p=0.360	
LDL-cholesterol (mg/dl)	137.2 ± 19.9	136.0 ± 24.6 ^{ab}	130.2 ± 24.5 ^a	145.7 ± 24.7 ^b	p = 0.007
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		-1.3 (-9.4, 6.8) p=0.747	-7.0 (-12.3, -1.7) p=0.012	8.4 (0.4, 16.4) p=0.040	
Triglycerides (mg/dl)	125.3 ± 62.7	117.6 ± 46.5 ^a	132.8 ± 74.2 ^a	119.0 ± 46.2 ^a	p = 0.486
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		-7.7 (-32.2, 16.8) p=0.518	7.4 (-14.7, 29.5) p=0.491	-6.4 (-19.3, 6.5) p=0.314	
Oxidized LDL (U/l)	57.8 ± 11.6	56.6 ± 10.3 ^a	55.8 ± 13.0 ^a	65.2 ± 16.3 ^b	p = 0.007
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		-1.2 (-4.8, 2.4) p=0.505	-2.0 (-5.3, 1.3) p=0.219	7.5 (1.5, 13.4) p=0.016	
Oxidized LDL/LDL-cholesterol	0.42 ± 0.08	0.42 ± 0.07 ^a	0.43 ± 0.09 ^a	0.45 ± 0.11 ^a	p = 0.482
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		0.00 (-0.03, 0.03) p=0.985	0.01 (-0.03, 0.04) p=0.628	0.03 (-0.01, 0.07) p=0.131	
Total cholesterol/HDL-cholesterol	5.00 ± 1.00	5.06 ± 1.14 ^a	5.11 ± 1.19 ^a	5.08 ± 1.29 ^a	p = 0.972
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		0.05 (-0.20, 0.30) p=0.678	0.10 (-0.14, 0.34) p=0.399	0.07 (-0.26, 0.40) p=0.660	
LDL-cholesterol/HDL-cholesterol	2.96 ± 0.64	2.97 ± 0.82 ^{ab}	2.82 ± 0.70 ^a	3.14 ± 0.89 ^b	p = 0.027
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		0.01 (-0.21, 0.23) p=0.943	-0.14 (-0.31, 0.02) p=0.083	0.18 (-0.08, 0.44) p=0.166	
Atherogenic index of LDL	1.23 ± 0.74	1.17 ± 0.66 ^a	1.32 ± 0.91 ^a	1.17 ± 0.64 ^a	p = 0.521

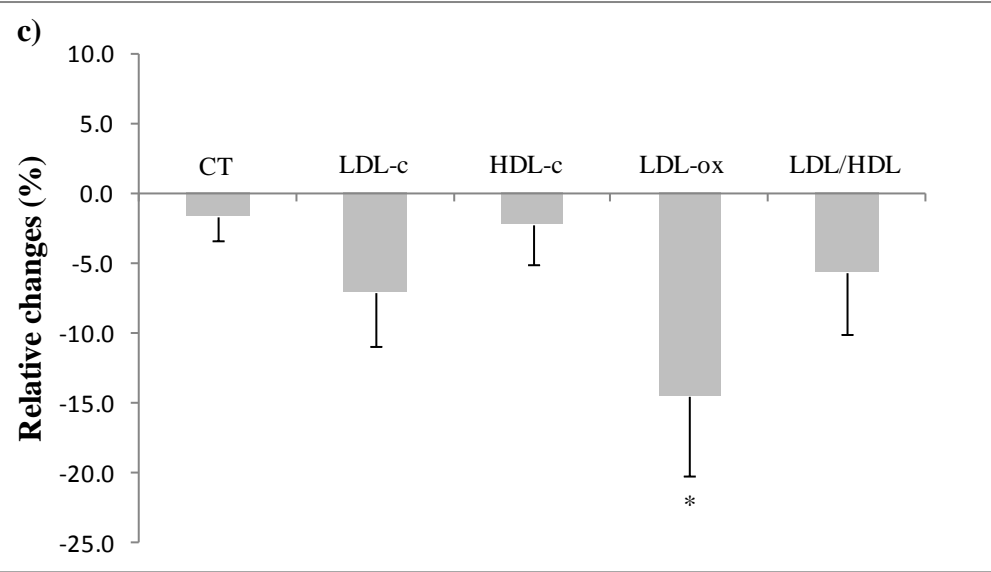
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		-0.06 (-0.31, 0.19) p=0.630	0.09 (-0.16, 0.35) p=0.461	-0.06 (-0.21, 0.09) p=0.410	
Systolic blood pressure (mm Hg)	121.2 ± 9.4	119.5 ± 10.2 ^a	119.5 ± 10.8 ^a	124.3 ± 14.1 ^a	p = 0.223
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		-1.7 (-5.0, 1.7) p=0.312	-1.7 (-4.7, 1.4) p=0.265	3.1 (-0.6, 6.8) p=0.098	
Diastolic blood pressure (mm Hg)	77.4 ± 9.3	75.4 ± 12.3 ^a	75.0 ± 8.6 ^a	76.4 ± 13.6 ^a	p = 0.471
Difference vs baseline (CI _{95%}), p		-2.0 (-4.7, 0.7) p=0.146	-2.4 (-5.0, 0.2) p=0.067	-1.1 (-4.4, 2.3) p=0.517	

Different superscript letters within a given row indicate significantly different values (mean ± SD of 21 volunteers, with Bonferroni adjustment for multiple comparisons)

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; GLM, general linear model; CI, confidence interval.

Fig 1 Relative percent changes in total cholesterol (CT), LDL-cholesterol (LDL-c), HDL-cholesterol (HDL-c), oxidized LDL (LDL-ox) and the LDL-cholesterol/HDL-cholesterol ratio after n-3 RF product consumption compared with: a) RF product consumption and b) NF product consumption; c) after RF product consumption compared with NF *Significantly different (*p<0.05; **p<0.01; Bonferroni's test)





V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

V. DISCUSIÓN INTEGRADORA

La nutrición constituye el principal factor modificable en el desarrollo de enfermedades crónicas. Hay abundantes pruebas de cómo las modificaciones en la dieta generan importantes efectos, positivos o negativos, en la salud de los consumidores a lo largo de la vida (WHO, 2003). Y también, cada vez hay más evidencias científicas acerca de la relación entre los lípidos de la dieta y el desarrollo de enfermedades coronarias, siendo las grasas saturadas y las grasas *trans* las que presentan una mayor relación con el riesgo de padecer ECV (Kromhout *et al.*, 1995; WHO, 2003). La carne y los productos cárnicos son alimentos que han sido asociados con el desarrollo de ECV (Sinha, Cross, Graubard, Leitzmann, & Schatzkin, 2009; WHO, 2003), debido, entre otros aspectos, a su perfil lipídico rico en AGS y pobre en AGP. Por todo ello, la industria cárnica está estudiando y desarrollando productos más saludables, siendo los lípidos uno de sus componentes bioactivos en los que más se ha investigado (Arihara, 2006; Jiménez-Colmenero, 2007; Jiménez Colmenero, Carballo, & Cofrades, 2001; Muguerza, Gimeno, Ansorena, & Astiasarán, 2004b). Una de las principales estrategias para el desarrollo de productos cárnicos saludables es la reformulación, generalmente basada en la sustitución de la grasa animal, habitualmente presente en ellos, por otra grasa que tenga unas características más en la línea con los objetivos nutricionales actuales: un menor contenido en AGS y mayor de AGM y AGP. La sustitución de los AGS por AGM o AGP resulta en una disminución del riesgo de ECV (Astrup *et al.*, 2011; Bhupathiraju & Tucker, 2011; Jakobsen *et al.*, 2009). Por todo esto y siguiendo el objetivo general planteado en esta memoria (apartado II): **diseño y desarrollo de productos cárnicos (con un contenido lipídico mejorado), así como la demostración de las propiedades saludables asociadas a su consumo (efecto funcional en sujetos con factor de riesgo cardiovascular)**, en este apartado se profundizará en los resultados obtenidos en el apartado IV de una manera que facilite su comprensión en conjunto.

En beneficio de la exposición y teniendo en cuenta los objetivos parciales planteados (apartado II), la discusión integradora se ha dividido en tres subapartados: en primer lugar se analizará el desarrollo de productos cárnicos saludables desde un punto de vista tecnológico, después las consecuencias del proceso de reformulación en los aspectos nutricionales y por último se llevará a cabo una evaluación del efecto funcional mediante un estudio de intervención.

V.1. DESARROLLO TECNOLÓGICO DE PRODUCTOS CÁRNICOS CON PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO

Para el desarrollo de productos cárnicos saludables se han empleado diferentes estrategias (apartado I.2.1), siendo sin duda la basada en el proceso de reformulación la más utilizada. En este ámbito, existen numerosos estudios que se han realizado con el fin de mejorar el perfil lipídico de los productos cárnicos. En tal sentido, ha sido muy utilizado el aceite de oliva como parte de la formulación de diversos productos cárnicos con el fin de aumentar su contenido en AGM (Bloukas & Paneras, 1993; Hong, Lee, & Min, 2004a; Lurueña-Martínez, Vivar-Quintana, & Revilla, 2004, entre otros). Otros aceites como el de maíz, algodón y soja, ricos en AGP se han utilizado como sustitutos de la grasa animal en el desarrollo de productos cárnicos para aumentar los niveles de estos ácidos grasos (Jiménez-Colmenero, 2007; Paneras, Bloukas, & Filis, 1998). La incorporación de grasas mediante el empleo de un único aceite (ya sea de origen vegetal o marino) mejora el perfil lipídico de los productos cárnicos, pero para obtener un perfil lipídico optimizado más en la línea de las recomendaciones nutricionales, se hace necesario utilizar una mezcla de aceites que pueda aportar los diferentes ácidos grasos en las proporciones adecuadas. Existen pocos estudios en productos cárnicos que hayan utilizado una mezcla de aceites para mejorar el perfil lipídico de los mismos (García-Íñiguez de Ciriano *et al.*, 2010; López-López, Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009; López-López, Cofrades, Ruiz-Capillas, & Jiménez-Colmenero, 2009; Paneras *et al.*, 1998).

Tal mejora, mediante el empleo de grasas de origen vegetal o marino, puede acarrear cierta problemática asociada a las condiciones de incorporación del aceite. Se han desarrollado diferentes estrategias tecnológicas para llevar a cabo la formulación de productos cárnicos saludables, las más importantes están recogidas en los apartados I.2.1.3, I.2.3 y I.2.4 de la presente memoria.

La utilización de pre-emulsiones (emulsiones de aceite en agua) se ha establecido como un buen método para estabilizar los aceites utilizados en las estrategias de reformulación (Bishop, Olson, & Knipe, 1993; Djordjevic, McClements, & Decker, 2004; Jiménez-Colmenero, 2007). Al emplearse este tipo de emulsiones como un ingrediente más en la preparación de los productos cárnicos, su composición y características fisicoquímicas afectan a diferentes propiedades del producto reformulado (Jiménez-Colmenero, 2007). Como primer paso para el desarrollo de productos cárnicos con el perfil lipídico optimizado, se llevó a cabo un estudio pormenorizado de diferentes tipos de pre-emulsiones que pudieran utilizarse posteriormente como ingredientes de productos cárnicos.

V.1.1. Desarrollo de las pre-emulsiones

Especial interés requiere el establecer las características de las pre-emulsiones, ya que posteriormente se van a añadir como ingredientes en productos cárnicos y deben permanecer estables y no disminuir los atributos de calidad de los mismos. La formulación de las emulsiones de aceite en agua mediante el uso de una proteína no cárnica, mejora la retención de grasa, ya que el aceite (o mezcla de aceites) puede permanecer estabilizado o inmovilizado en la matriz proteica. Esto permite a la proteína cárnica tener disponibilidad para actuar en el sistema y reduce las posibilidades de que se separe la mayor parte del aceite de la estructura del producto cárnico, permaneciendo estable durante todo el conjunto de condiciones ambientales que se va a encontrar a lo largo del procesado, almacenamiento y consumo (Djordjevic *et al.*, 2004).

El proceso que generalmente se aplica para el desarrollo de estas pre-emulsiones varía según autores, siendo el más ensayado el propuesto por Hoogenkamp (1989a, 1989b). Por lo general, se han utilizado fundamentalmente dos tipos de estabilizadores proteicos, por un lado caseinato sódico (CS) (habitual en productos cárnicos no fermentados) y por otro aislado de proteína de soja (APS) (en fermentados). La industria alimenticia también dispone de otro tipo de emulsificantes como los provenientes del lactosuero. En la literatura se puede encontrar información de las características de diferentes tipos de emulsiones de aceite en agua con aplicaciones en productos alimenticios (Lee, Choi, & Moon, 2006; Roesch & Corredig, 2002), pero sus propiedades tecnológicas son considerablemente afectadas por variaciones de diferentes factores, entre los que se encuentra la combinación de ingredientes tales como el aceite y el emulsificante. También se ha ensayado el empleo de transglutaminasa como agente de entrecruzamiento (gelificación en frío) para formar una mayor cantidad de enlaces inter e intramoleculares (Lee, Choi, & Moon, 2006). Los aceites vegetales han sido utilizados como fuente de AGM y AGP y aceites de origen marino como fuentes de EPA y DHA para la producción de productos cárnicos con perfil lipídico más saludable (Jiménez-Colmenero, 2007), pero no se ha encontrado en la literatura mención alguna a características de las pre-emulsiones utilizadas como sustitutos de grasa animal, particularmente cuando está constituido por una combinación lipídica más saludable (de origen vegetal y marino).

En los siguientes apartados se comentan los resultados más significativos del estudio del diseño y caracterización de las diferentes pre-emulsiones desarrolladas como futuras fuentes principales de grasa en los productos reformulados (apartado

IV.1.1.). Se elaboraron cinco pre-emulsiones diferentes en las que la combinación lipídica fue semejante y sólo se varió el estabilizador proteico. Se utilizaron como emulsificantes individuales CS y APS, ya que son los más utilizados en la industria cárnica. También se ensayaron diferentes mezclas proteicas buscando diferentes características de la pre-emulsión final. Se empleó una mezcla de CS con transglutaminasa, para obtener una emulsión con mayor gelificación debido a los enlaces que forma la transglutaminasa con los residuos de lisina y glutamina de las proteínas (Lee, Choi, & Moon, 2006). A la mezcla anterior de emulsificantes se añadió una mezcla de proteína cárnica para valorar las consecuencias de su presencia junto con la transglutaminasa. Por último, y con este mismo motivo, se ensayó una pre-emulsión utilizando una mezcla de CS, APS y transglutaminasa como agentes emulsificantes.

V.1.1.1. Aspectos nutricionales

Dado que estas emulsiones se han obtenido para ser un ingrediente a incorporar en productos cárnicos, conocer su composición lipídica resulta fundamental. El análisis de este perfil lipídico y el de los componentes mayoritarios de las pre-emulsiones se ha detallado en el apartado IV.1.1. El porcentaje utilizado en la formación de las pre-emulsiones fue el siguiente: 44,39% de aceite de oliva, 37,87% de aceite de linaza y 17,74% de aceite de pescado. Un análisis de los componentes mayoritarios de las pre-emulsiones dió como resultado que todas ellas contenían alrededor de un 53% de materia grasa y un 42% de humedad, siendo el 5% restante fundamentalmente proteína.

Los perfiles lipídicos de los tres aceites fueron bastante diferentes en cuanto a composición cuali y cuantitativa (apartado IV.1.1.: tabla 2). En la **figura 1** se recogen los porcentajes de AGS, AGM y AGP de los tres aceites y de la combinación utilizada. Como cabría esperar, el aceite de oliva es una gran fuente de AGM, siendo en su mayoría ácido oleico, pero no aporta gran cantidad de AGP. Sin embargo, el aceite de linaza contiene una alta cantidad de AGP, siendo el AGP n-3 ácido alfa-linolénico el mayoritario (53% del total). El aceite de pescado pese a aportar una cantidad considerable de AGS, es una fuente de AGP n-3, como EPA y DHA, que están en una cantidad cercana al 19% y 12% sobre el total, respectivamente. En los apartados I.2.5.2, I.2.5.3 y I.2.5.4 de la presente memoria se describen los beneficios sobre la salud del consumidor que el consumo de estos aceites conlleva. Con la combinación de los tres aceites lo que se ha intentado es recoger los beneficios de los tres aceites, obteniendo un perfil lipídico más en consonancia con las recomendaciones

nutricionales actuales (FAO/WHO, 2010). En tal sentido, la combinación lipídica presenta una baja cantidad de AGS con solo un 11% de ácido mirístico y palmítico, a los que se les reconocen propiedades aterogénicas (Wood *et al.*, 2004). Además se consigue una importante cantidad tanto de AGM como de AGP n-3 (26%), lo que promueve la no disminución del contenido de AGM (ya que en la carne se encuentran entre el 30-60%) y aumentar ALA, EPA y DHA, tal y como recomiendan instituciones como la EFSA (2010).

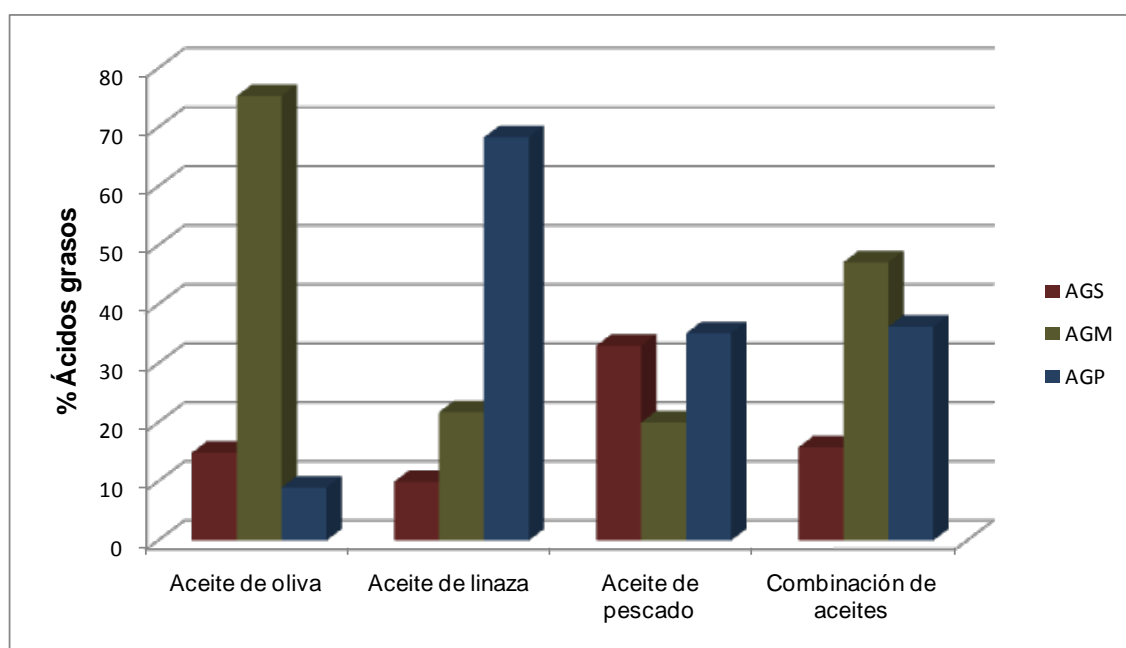


Figura 1. Perfil lipídico general de los aceites empleados, así como de su combinación. Resultados expresados en % de ácidos grasos respecto del total.

Aunque las implicaciones sobre la salud del consumo de grasa se han relacionado con la cantidad de determinados ácidos grasos, existen aún algunas recomendaciones basadas en proporciones específicas de ácidos grasos. Así, existen recomendaciones para mantener el ratio AGP/AGS por encima de 0,4 y la proporción de AGP n-6/n-3 por debajo de 4 (Enser, 2000; Wood *et al.*, 2004). En el caso de la combinación lipídica de aceite de oliva, linaza y pescado, las proporciones AGP/AGS y n-6/n-3 fueron 2,3 y 0,4 respectivamente.

Por lo tanto se puede afirmar que el uso de una combinación lipídica de aceites de oliva, linaza y pescado, puede resultar en una mejora del perfil lipídico de los productos cárnicos a los que puede ser incorporada en forma de pre-emulsión. Dependiendo del nivel de sustitución de la grasa animal, estos productos pueden

resultar con una menor cantidad de AGS y mayor cantidad de AGM y AGP (especialmente n-3 de cadena muy larga).

V.1.1.2. Aspectos tecnológicos

El estudio de las propiedades físico-químicas de las pre-emulsiones ayudó a entender su papel como ingrediente en la elaboración de productos cárnicos.

El uso de diferentes agentes emulsificantes en las pre-emulsiones apenas ejerció efecto sobre el **color** de las mismas. Sin embargo, si se observó que las pre-emulsiones que contenían transglutaminasa (TGM) tenían un **pH** significativamente más básico que aquellas que no la contenían. (Apartado IV.1.1: tabla 3).

Es importante remarcar la buena **estabilidad** de todas las emulsiones estudiadas, tanto frente al calentamiento como al almacenamiento (3 días, 2 °C). Característica que es muy importante para su utilización como ingredientes en productos cárnicos tipo gel-emulsión, sometidos a procesos térmicos y de conservación.

Los parámetros **morfológicos, texturales y reológicos** de las pre-emulsiones proporcionan información relevante para establecer criterios de utilización de una u otra emulsión para la elaboración del producto final.

El análisis de la morfología, mediante microscopía electrónica de barrido, evidenció que la emulsión de CS presentaba una estructura homogénea con cavidades más amplias que el resto de emulsiones (apartado IV.1.1: figura 2). Esta morfología se asoció posteriormente con sus propiedades reológicas y texturales, en las que tuvo un comportamiento más viscoso que de gel, sin punto de ruptura en el test de penetración y con unos módulos elástico (G') y viscoso (G'') fuertemente dependientes de la frecuencia (apartado IV.1.1: tabla 4, apartado IV.1.1: figura 1). Las dos pre-emulsiones que contenían APS, presentaban estructuras proteicas asociadas a la proteína de soja, mientras que las emulsiones con TGM parecieron más compactas y con mayor número de pequeñas cavidades que el resto. A través de la medida de la textura y de las propiedades reológicas dinámicas, se observó que aquellas que contenían APS se comportaron como geles pero de manera muy débil. De las tres pre-emulsiones que utilizaron transglutaminasa, fue la que contenía también CS y APS la que más se diferenció de las otras dos a nivel de textura.

Para el desarrollo de salchichas tipo frankfurt “saludables”, como todas las pre-emulsiones presentaron buena estabilidad, se escogieron aquellas que presentaron mayores diferencias en los análisis textural y reológico, que fueron las estabilizadas individualmente con CS y APS, además de la que utilizó una mezcla de CS, APS y transglutaminasa. En el caso de los patés reformulados, se optó por la utilización de la pre-emulsión con APS como estabilizador proteico. Esto fue debido a que esta pre-emulsión presentaba una textura cercana a la del paté.

V.1.2. Desarrollo de los productos cárnicos

Los productos cárnicos tratados por calor (sistemas gel/emulsión) son un importante grupo de los productos cárnicos, entre los que las salchichas tipo frankfurt ocupan un papel mayoritario a nivel de consumo. Los patés pertenecen también a este grupo de productos e igualmente son ampliamente consumidos en países como España, Francia, Alemania y Dinamarca (Fernández-López, Sayas-Barberá, Sendra, & Pérez-Álvarez, 2004; Martín, Antequera, Muriel, Pérez-Palacios, & Ruiz, 2009). Sin embargo, el consumo excesivo de ambos productos presenta connotaciones negativas para la salud debido a su contenido graso y su perfil lipídico. La reformulación de este tipo de productos se ha utilizado para obtener mejoras en estos aspectos negativos, a través de la reducción de la cantidad de grasa animal y/o sustitución parcial o total de la misma por otra grasa con mejor perfil lipídico (Jiménez-Colmenero, 2007).

Una vez evaluadas las diferentes pre-emulsiones, se introdujeron en dos matrices cárnicas, que corresponden a productos de amplio consumo y que además aportan variedad en el estudio de intervención en humanos. Se trató de salchichas tipo frankfurt y patés, empleando varias de las pre-emulsiones obtenidas (apartado IV.1.1.). Esta reformulación se planteó en base a dos objetivos, por un lado la disminución de su contenido graso y por otro la mejora de perfil lipídico.

En el desarrollo de salchichas tipo frankfurt con el perfil lipídico optimizado se determinó establecer un contenido graso reducido del 12%, evaluando el efecto de la sustitución total de la grasa animal (tocino de cerdo) por las pre-emulsiones elegidas en el apartado V.1.1.2. (CS, APS y CS+APS+transglutaminasa).

En el caso de los patés, aprovechando que este tipo de productos cárnicos contienen un alto porcentaje de grasa ($\geq 30\%$), se evaluó el efecto de la reducción de grasa a la mitad (15%). Al igual que en las salchichas, también se formularon patés de contenido graso reducido (15%) en los que se sustituyó la grasa animal por la combinación de aceites en pre-emulsión. La reformulación de los patés solo se llevó a

cabo utilizando la pre-emulsión con APS como estabilizador proteico, pero esta vez la sustitución del tocino de cerdo se hizo tanto de manera parcial como total. Unido a esta sustitución total y parcial de la grasa animal, se determinó incluir un sustituto para paliar los posibles efectos negativos, a nivel tecnológico, de la reformulación. El sustituto de grasa fue elaborado a base de harina de konjac, un polisacárido con interesantes propiedades gelificantes. Se utilizó de gel de konjac como ingrediente a tres niveles (0%, 7,5% y 15%) sustituyendo parcial o totalmente la grasa animal por las pre-emulsiones.

V.1.2.1. Efecto de la reducción de grasa

Los patés se caracterizan por tener una gran cantidad de grasa (toda ella grasa animal) en su composición, oscila entre un 25% y un 40%. Por ello, este tipo de productos tienen un alto contenido energético (entre 300 y 400 kcal/100 g) y se aleja de lo que se considera como alimento saludable. Existen algunos estudios en los que se ha evaluado la utilización de diversos compuestos como sustitutos de grasa (Estévez *et al.*, 2005a; Viana *et al.*, 2005; Kaack & Pedersen, 2005; Martín *et al.*, 2009), pero no se conocen aquellos que analicen el efecto de la reducción de grasa ajustando los niveles de agua y manteniendo el nivel de proteína constante. Debido a esto, se planteó estudiar el efecto de la reducción de grasa animal sobre las propiedades tecnológicas del paté. Para ello se reformuló el producto disminuyendo la cantidad de grasa animal incorporada a la mitad (apartados IV.4, IV.5 y IV.6).

A la hora de reducir la cantidad de grasa de los patés es muy importante tener en cuenta las **propiedades ligantes de agua y grasa** del producto final, ya que serán las que condicionen, en gran parte, su textura. En general se puede afirmar que la reducción de grasa en los patés ha producido una disminución de las propiedades ligantes de agua y grasa, favoreciendo la liberación tanto de agua como de grasa cuando el producto fue sometido a tratamiento térmico (apartado IV.1.4: tabla 4). Como consecuencia directa, el rendimiento disminuyó (apartado IV.1.5: figura 1). Este comportamiento se produce generalmente cuando la grasa es sustituida por agua (Claus, Hunt, & Kastner, 1989; Jiménez-Colmenero, Barreto, Mota, & Carballo, 1995). En tal caso, puesto que los niveles de proteína son constantes, se produce una disminución de la concentración de la proteína que participa en la formación de la emulsión cárnica, con lo que las propiedades ligantes de agua y grasa se ven reducidas en los productos que tengan un menor nivel de grasa. Durante la **conservación en refrigeración**, en los últimos días se produjo una reabsorción del fluido perdido en la muestra con la mitad de grasa (apartado IV.1.5: tabla 4),

mejorando así sus propiedades ligantes de agua y grasa, debido en gran parte al atrapamiento físico tras el calentamiento dada la naturaleza de la matriz proteica.

En cuanto a parámetros de **textura** y **propiedades reológicas dinámicas**, la reducción de grasa en los patés supuso la obtención de una matriz cárnica con menor calidad de gel (A_n y $G'_0 - G''_0$ más elevados) y menor estabilidad de la emulsión (apartado IV.1.5: tabla 3), que se tradujo en un producto de consistencia más débil y mejor untabilidad (apartado IV.1.4: tabla 6). Este hecho es coherente con las propiedades ligantes de agua y grasa ya comentadas, estableciéndose una gran correlación entre los parámetros de textura (entre 0,856 y 0,970) y la relación grasa/agua de los patés. Así, cuanto mayor fue este parámetro mayor fue la dureza de los productos.

Se obtuvieron patés más amarillos, rojos y oscuros al reducir la grasa de los mismos, estos cambios significativos en el **color** variaron a lo largo del periodo de **conservación en refrigeración**, donde la luminosidad de los patés bajos en grasa aumentó hasta casi alcanzar la de los patés control (apartado IV.1.4: tabla 5; apartado IV.1.5: tabla 5).

La reducción de grasa en los patés no produjo cambios significativos en la **oxidación lipídica** de los mismos, tanto los patés con el 30% como los del 15% de grasa tuvieron resultados muy similares de oxidación lipídica (valores TBARS) a lo largo de la conservación (apartado IV.1.6: tabla 2). Ambos obtuvieron unos valores relativamente bajos de oxidación, entre 0,113 y 0,151 mg MDA/kg muestra.

El **análisis microbiológico** de los patés determinó una baja carga microbiana, por debajo de 10^3 unidades formadoras de colonias (ufc)/g para aerobios totales y menor a 1 log ufc/g para enterobacterias y bacterias acidolácticas (apartado IV.1.6.: tabla 3). El análisis de la masa cárnica cruda (previa a la cocción) permitió establecer que existía mayor contaminación (tanto de aerobios como de enterobacterias) en la masa baja en grasa, lo que pudo deberse a la mayor cantidad de agua del producto (apartado IV.1.4: tabla 7).

La determinación del contenido en **aminas biógenas** de ambos patés no guardó relación específica con el contenido graso (apartado IV.1.6.: tabla 4). Si bien es

cierto que sí se observaron diferencias significativas en los valores de las distintas aminas a lo largo del periodo de conservación.

En todo caso se puede señalar que tanto el consumo del paté control como el de bajo en grasa no suponen un riesgo para la salud del consumidor, en términos de seguridad microbiológica.

Mediante un **análisis sensorial** se determinó que el único parámetro en el que los panelistas observaron diferencias fue el del color, donde los patés bajos en grasa se apreciaron como más oscuros (apartado IV.1.4: tabla 8), dato coincidente con el análisis objetivo del color. En general, no se observaron diferencias significativas, y los patés obtuvieron puntuaciones por encima del valor medio en el resto de parámetros. Por ello se puede decir que los patés bajos en grasa fueron productos sensorialmente aceptables.

A tenor de todos estos análisis se puede concluir que la reducción de grasa en patés resultó ser una tecnología factible. Los principales cambios que produjo fueron a nivel de color y textura (debido a la disminución de sus propiedades ligantes), pero en el resto de parámetros evaluados, la reducción de grasa apenas produjo cambios relevantes.

V.1.2.2. Efecto de la sustitución de la grasa animal por grasas de origen vegetal y marino

Con el objetivo de mejorar el perfil lipídico de diferentes productos cárnicos, se llevó a cabo una reformulación de salchichas tipo frankfurt y patés mediante la disminución de la cantidad total de grasa y la sustitución de tocino de cerdo por una pre-emulsión de aceites de origen vegetal (oliva y linaza) y marino (pescado). Pese a que existen numerosos estudios relacionados con el desarrollo de productos cárnicos con mejora de su perfil lipídico (Jiménez-Colmenero, 2007), el uso de este tipo de pre-emulsiones con esa combinación de aceites y estabilizadores no ha sido estudiado como ingrediente en la formulación de productos cárnicos. Por eso resulta de interés la evaluación de diferentes características tecnológicas que han podido verse alteradas por la utilización de esta estrategia.

La reformulación de los productos cárnicos produjo cambios significativos en las **propiedades ligantes de agua y grasa**. La reformulación en salchichas tipo frankfurt apenas produjo diferencias en las pérdidas por procesado, sólo la muestra

con la pre-emulsión de CS presentó mayores pérdidas que las demás (apartado IV.1.2.: tabla 5). Los patés en los que se sustituyó totalmente la grasa animal por la emulsión de aceite en agua (aceites de origen vegetal y marino) obtuvo mejores propiedades ligantes de agua y grasa (menores pérdidas totales) que en los patés donde la sustitución fue parcial o donde simplemente se disminuyó el contenido en grasa (toda grasa animal) (apartado IV.1.5.: tabla 4). Este dato está en concordancia con las **propiedades reológicas dinámicas**, donde el paté en el que la sustitución es parcial presenta peor calidad de gel al poseer su matriz cárnica mayor rigidez (apartado IV.1.5.: figura 2 y tabla 3). Esto supone que aunque ambos productos sean tipo gel-emulsión, las diferencias en composición y procesado hacen que su comportamiento frente al tratamiento térmico sea diferente.

Si se analizan las pérdidas de agua y grasa a lo largo de la **conservación (purge loss)**, se encuentra que los productos cárnicos que han sido reformulados sustituyendo grasa animal (ya sea total o parcialmente, por diferentes pre-emulsiones) sufren menos pérdidas iniciales que el producto control bajo en grasa, pero que conforme pasan los días, esta diferencia desaparece (apartado IV.1.2.: tabla 5 y apartado IV.1.5.: tabla 4).

Por lo tanto, se puede concluir que la reformulación de salchichas tipo frankfurt y patés mediante la total sustitución de la grasa animal por una emulsión de aceite (mezcla de aceites de oliva, linaza y pescado) en agua, no altera, sino que incluso mejora las propiedades ligantes de agua y grasa.

El tipo de pre-emulsión utilizado afectó a la **microestructura** de las salchichas, todas las muestras reformuladas presentaron mayor desorganización a nivel estructural de la matriz, desapareciendo la apariencia esponjosa (menos cavidades) y mostrando una morfología más compacta. Tales características favorecen la formación de matrices muy fuertes, aumentando los **parámetros texturales** de dureza, elasticidad y masticabilidad al compararse con los de la salchicha control (apartado IV.1.2.: tabla 7). En el caso de los patés, se realizó un test de penetración para poder observar los cambios de la reformulación en la textura. La sustitución total o parcial de tocino de cerdo por las pre-emulsiones de aceite en agua no produjo diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos (apartado IV.1.4.: tabla 6). Atendiendo al efecto de la **conservación** se observa que tanto en las salchichas como en los patés reformulados no se producen grandes cambios en los parámetros de textura (apartado IV.1.2.: tabla 7, apartado IV.1.5.: tabla 7).

En consecuencia, el efecto de la sustitución de la grasa animal por una mezcla de aceites (de origen vegetal y marino) en los parámetros texturales varía con las características de la matriz, produciendo mayores cambios en las salchichas que en los patés, en los cuales apenas se observaron variaciones.

El desarrollo de salchichas tipo frankfurt y patés con el perfil lipídico mejorado produjo cambios significativos en la medida objetiva del **color**. En los productos reformulados se observó que los valores de luminosidad y tendencia al amarillo se vieron incrementados con la sustitución total o parcial del tocino de cerdo por la combinación lipídica saludable (apartado IV.1.2.: tabla 6; apartado IV.1.4.: tabla 5). Es en la tendencia al rojo donde se observaron diferencias en el efecto de la reformulación según la matriz cárnica, en las salchichas tipo frankfurt se vió incrementado este parámetro, mientras que en los patés se observó una disminución, más acusada tanto mayor fuera el grado de sustitución de la grasa animal. Analizando estos mismos parámetros a lo largo de la **conservación**, en las salchichas tipo frankfurt se produjo un descenso en todos los parámetros, mientras que en el caso de los patés (apartado IV.1.5.: tabla 5) los cambios, aunque significativos, cuantitativamente no fueron realmente importantes.

Como mediante la reformulación de las salchichas y los patés se ha introducido una mezcla de aceites vegetales ricos en ácidos grasos mono y poli-insaturados, parece necesaria la determinación de la **oxidación lipídica** para evaluar si este aumento de la insaturación se ha traducido también en mayores niveles de oxidación. Para ello se llevó a cabo una medida de TBARS encontrándose que en todas las salchichas y todos los patés reformulados, la oxidación obtuvo valores por debajo de del umbral organoléptico de la oxidación en productos cárnicos procesados (Cáceres, García, & Selgas, 2008; Mercadante, Capitani, Decker, & Castro, 2010). Tanto en las salchichas tipo frankfurt como en los patés, la reformulación de los mismos con la mezcla de aceites rica en AGP supuso un aumento en la oxidación lipídica (apartado IV.1.3.: tabla 3, apartado IV.1.6.: tabla 2). En el caso de las salchichas, las diferentes pre-emulsiones utilizadas provocaron variación en los niveles de oxidación. De los tres tipos de pre-emulsiones empleadas, las salchichas con la pre-emulsión que contenía únicamente APS fueron las que menores valores de oxidación mostraron, seguidas de las elaboradas con la pre-emulsión con CS, ambas con valores muy por debajo de las salchichas con la pre-emulsión que utilizó una mezcla de CS, APS y transglutaminasa. Se ha descrito que tanto el CS como el APS tienen propiedades antioxidantes en emulsiones de aceite en agua a través de un mecanismo de quelación de metales y/o

secuestro de radicales (Faraji, McClements, & Decker, 2004). Además, el APS posee actividad antioxidante asociada a la presencia de ciertos compuestos como las isoflavonas (Faraji *et al.*, 2004). Una de las explicaciones al hecho de que las salchichas en las que se utilizó una pre-emulsión con transglutaminasa obtuvieran valores de oxidación lipídica muy superiores a los de las demás, podría ser la posible interacción de la transglutaminasa con alguno de los mecanismos antioxidantes del CS o el APS. La oxidación a lo largo del periodo de conservación se vió también más elevada en las salchichas reformuladas que en la muestra control, en la que apenas varió.

Respecto a los patés, también se observó un claro aumento de la oxidación en los productos con los mayores niveles de insaturación, siendo el efecto más acusado en los patés donde la sustitución de la grasa animal fue total. Sin embargo, pese a que durante la conservación aumentó el grado de oxidación lipídica de los patés, no lo hizo en la misma proporción que en las salchichas, permaneciendo los valores de TBARS relativamente más bajos. Esto puede deberse a las diferencias de procesado entre uno y otro producto. La temperatura alcanzada durante el proceso térmico de los patés (80 °C centro pieza), mayor a la de las salchichas (70 °C centro pieza), pudo originar la formación de productos derivados de la reacción de Maillard con actividad antioxidante. Tales mecanismos explican el hecho de que los valores de oxidación sean inferiores en carne tratada a altas temperaturas y/o periodos largos calentamiento que aquella que ha sido tratada a inferiores temperaturas por periodos de tiempo más cortos (Bailey, Shi-Lee, Dupuy, St. Angelo, & Vercellotti, 1987; Cross, Leu, & Miller, 1987). En general, se puede decir que la sustitución de la grasa animal por una mezcla de aceites ricos en AGM y AGP en salchichas tipo frankfurt y patés, supuso un aumento de la oxidación lipídica, pero no en proporciones suficientes como para generar cambios organolépticos en los productos. Esta relativa baja oxidación puede deberse, adicionalmente, al efecto antioxidante de aditivos adicionados (como el nitrito) durante el procesado de los productos, o aquellos contenidos en los aceites de origen vegetal y marino (tocoferoles).

Tanto en las salchichas tipo frankfurt como en los patés se llevó a cabo un **análisis microbiológico** para determinar si las diferencias en la formulación supusieron cambios importantes a nivel de crecimiento de microorganismos. En el caso de las salchichas tipo frankfurt, las que fueron reformuladas con una pre-emulsión de aceite en agua con CS o APS como estabilizadores, presentaron valores significativamente más altos de aerobios viables totales al final del periodo de

conservación, que las salchichas control o aquellas que contienen TGM en la pre-emulsión (apartado IV.1.3.: figura 2). Los niveles de enterobacterias permanecieron por debajo de 1 log ufc (unidades formadoras de colonias)/g durante todo el periodo de almacenamiento. En el caso de los patés, la reformulación no supuso una modificación clara de la población microbiana (aerobios viables totales), permaneciendo estos durante el periodo de almacenamiento en niveles inferiores a 3 log ufc/g (apartado IV.1.6.: tabla 3). Esto puede ser debido a la alta temperatura alcanzada durante el procesado (80 °C centro pieza) y a las condiciones de almacenamiento en los contenedores herméticos (85 días a 2 °C). Tanto las enterobacterias como las bacterias acidolácticas siempre estuvieron por debajo del valor de 1 log ufc/g. Puede decirse por lo tanto, que las condiciones de procesado explican la calidad microbiológica de estos productos, que en general fue la adecuada.

Las **aminas biógenas** son compuestos de alto interés debido fundamentalmente a dos razones: podrían utilizarse como indicadores de calidad y porque niveles elevados de aminos biógenos pueden suponer un riesgo tóxico para determinados consumidores (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004b). Diferentes aminos biógenos fueron determinadas a lo largo del periodo de conservación tanto en salchichas como en patés. La reformulación de los productos cárnicos produjo cambios significativos en los valores de las aminos biógenos (apartado IV.1.3.: tabla 5, apartado IV.1.6.: tabla 4). La reformulación originó un aumento de los niveles iniciales de histamina al compararse con los productos control. En el resto de aminos determinadas también se observaron cambios asociados al proceso de formulación. A lo largo de la **conservación** la modificación más apreciable en los niveles de aminos biógenos se observaron en tiramina y cadaverina. Estas aminos, en el caso de las salchichas tipo frankfurt, se vieron incrementadas al final de la conservación en las muestras que habían sido reformuladas y que contenían CS y APS en la pre-emulsión. Lo que coincide con el mayor nivel de aerobios viables totales de estas dos muestras. El hecho de que en el caso de los patés los niveles de tiramina permanecieran muy bajos y constantes a lo largo de la conservación, se debe, fundamentalmente, a los bajos niveles de bacterias acidolácticas, las principales productoras de tiramina en productos cárnicos cocidos almacenados en vacío (Ruiz-Capillas & Jimenez-Colmenero, 2004a). Atendiendo a los valores obtenidos tanto en las salchichas como en los patés, la reformulación de ambos productos no planteó ningún problema de seguridad en cuanto a niveles de aminos biógenos se refiere.

Con independencia de lo que indiquen los parámetros físico-químicos, es la cualidad **sensorial** la que determina el grado de aceptación de los productos y por tanto de las estrategias de reformulación (apartado IV.1.2: tabla 8, apartado IV.1.4.: tabla 8). Las salchichas reformuladas fueron consideradas como más duras (comparadas con la salchicha control) por el panel de catadores. Del resto de parámetros evaluados (jugosidad, sabores extraños, textura, olor y sabor) pese a obtener puntuaciones inferiores que la muestra control, ninguno de ellos fue estadísticamente significativo a excepción de la aceptabilidad general. Las salchichas con la pre-emulsión de APS y la que contenía TGM fueron las peor puntuadas y aunque significativamente diferentes a la salchicha control, obtuvieron una calificación aceptable. Fue la muestra con CS la que mejor puntuó de las tres y la que no se diferenció significativamente de la aceptabilidad general de la salchicha control. En el caso de los patés solo se observaron diferencias significativas en la apreciación del color en los patés reformulados donde la sustitución de tocino de cerdo por la mezcla de aceites fue total. En términos de olor, sabor y aceptabilidad general la puntuación fue semejante y siempre por encima de los valores medios de la escala. Tras este análisis sensorial se puede concluir que la reformulación de salchichas tipo frankfurt y patés con una mezcla de aceites (de origen vegetal y marino) no supuso una disminución significativa en la aceptación sensorial de los productos por parte de los panelistas.

V.1.2.3. Efecto de la incorporación de gel de konjac

Debido a que los procesos de reducción y sustitución de la grasa animal por grasas más insaturadas pueden tener implicaciones en las propiedades tecnológicas y sensoriales, diferentes estrategias han sido utilizadas para moderar las posibles consecuencias. En el caso del paté la reducción de grasa animal fue importante y por ello se optó también por estudiar el uso de un sustituto de la grasa, a base de gel de de konjac (glucomanano). El konjac es un polisacárido que ya ha sido utilizado como sustituto de la grasa en la reformulación de otros compuestos cárnicos (Chin, Keeton, Miller, Longnecker, & Lamkey, 2000; Jiménez-Colmenero *et al.*, 2010; Kao & Lin, 2006), ya que posee importantes propiedades tecnológicas y se le reconocen propiedades saludables. Al respecto, recientemente ha sido incluido en la lista de ingredientes con propiedades saludables de la Unión Europea (Reglamento UE nº 432/2012). Mediante este estudio se analizó su comportamiento (en cantidades del

7,5% y el 15%) en los patés reformulados con el 15% de grasa, donde la grasa animal se ha sustituido parcial y totalmente por la pre-emulsión (apartados IV.4, IV.5 y IV.6).

La utilización de konjac en los patés con sustitución parcial de la grasa disminuye la cantidad de fluido liberado por el tratamiento térmico (**estabilidad de la emulsión**, apartado IV.1.4.: tabla 4), en consonancia con lo observado al analizar el **rendimiento** a la cocción (apartado IV.1.5.: figura 1). Estos resultados se pueden explicar por el hecho de que gran parte del agua adicionada se localiza formando parte del gel de konjac por lo que se encuentra atrapada dentro del gel, no así la adicionada a la muestra sin konjac, que no se haya inicialmente afianzada en la matriz. Por lo tanto se podría decir que el gel de konjac genera un efecto positivo en la estabilidad de la emulsión. Si se observan las **pérdidas durante la conservación** (apartado IV.1.5.: tabla 4), se aprecia que el gel de konjac no produce un efecto claro. Pese a que en valores absolutos las muestras con un 7,5% de gel de konjac presentan mejores resultados, estos no resultan estadísticamente significativos.

Es a través de la determinación de las **propiedades reológicas dinámicas** donde queda patente que la adición de gel de konjac a los patés reformulados, genera cambios estructurales que llevan a formar estructuras más rígidas y firmes, similares a las de un paté control (30% grasa). Aspecto que se recoge en los diferentes parámetros estudiados, pero con mayor claridad en los valores de G_0' y G_0'' (apartado IV.1.5.: tabla 3). Este hecho confirma los resultados de **textura** evaluados mediante un test de penetración, donde la dureza en los patés con el 15% de konjac presentó valores similares a los de los productos formulados con 100% grasa animal (apartado IV.1.4.: tabla 6).

En general, el efecto de la adición de gel de konjac en el **color** de los productos es reducido. Sólo en las muestras en la que la sustitución de grasa ha sido total, los cambios adquieren mayor relevancia, generando patés con tonalidades más amarillentas, claras y menos rojizas (apartado IV.1.4.: tabla 5). A lo largo del periodo de **conservación** la evolución del color en los productos con konjac fue semejante a la muestra en el que no ha sido adicionado, apareciendo tan solo pequeñas variaciones en la luminosidad en el paté donde la sustitución de grasa ha sido total (apartado IV.1.5.: tabla 5). La presencia de konjac no condiciona los cambios de color asociados a procesos de conservación.

La adición de gel de konjac en los patés reformulados donde la sustitución de tocino de cerdo fue total supuso una reducción de los niveles de **oxidación lipídica**, que solo alcanzó niveles significativos en los patés donde la sustitución de grasa animal fue parcial, al cabo de los 85 días de conservación.

La formación de **aminas biógenas** en los patés no fue afectada por la presencia de gel de konjac. El cambio más apreciable fue el aumento en los niveles iniciales de cadaverina y agmatina (apartado IV.1.6.: tabla 4).

La adición de gel de konjac produjo diferencias significativas en los diferentes **parámetros sensoriales** evaluados (apartado IV.1.4.: tabla 8). Existe una relación inversa entre la adición de gel de konjac y la percepción de sabor y olor de los productos, así como la percepción grasa y la aceptabilidad general, puntuando incluso por debajo del 5 en una escala de 10. En consecuencia, la limitación del nivel de adición de gel de konjac en términos de aceptabilidad general, quedó establecido en el 7,5%.

Puede concluirse, por lo tanto, que la utilización de gel de konjac como sustituto de grasa animal en patés, produjo ciertas modificaciones en las propiedades tecnológicas de los mismos. Los cambios más significativos se producen a nivel textural donde la adición de gel de konjac endurece el producto, asemejándose más a los patés totalmente elaborados con grasa animal. La limitación más importante es a nivel organoléptico, donde el uso de este sustituto, por encima de determinados porcentajes, produce apreciaciones negativas.

V.2. ASPECTOS NUTRICIONALES DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS DESARROLLADOS

A la hora de evaluar aspectos nutricionales conviene recordar que la reformulación de los productos cárnicos se hizo en base a la disminución de su contenido graso y optimización de su perfil lipídico. En el caso de las salchichas se ajustó el contenido graso al 12% y en el de los patés al 15%. En ambos productos se sustituyó parcial y/o totalmente el tocino de cerdo, utilizado como fuente de grasa animal, por una pre-emulsión de aceite en agua de una mezcla de aceites (oliva, linaza y pescado). A lo largo de este apartado se evaluarán los aspectos nutricionales más

relevantes de los productos cárnicos desarrollados, a nivel de componentes mayoritarios y, sobre todo, a nivel de perfil lipídico, ya que es en la composición de ácidos grasos donde mayor variación se ha generado y a través de la cual se esperaba obtener productos con efectos funcionales.

V.2.1. Componentes mayoritarios

La composición de los productos apenas está condicionada por el tipo de pre-emulsiones utilizadas en la reformulación de **salchichas tipo frankfurt** (apartado IV.1.2.: tabla 3). Donde se apreciaron mayores diferencias ($p < 0,05$) fue en la cantidad de proteínas, que varió entre 17,8% (salchicha control) y 19,4% (salchicha con la pre-emulsión de CS). Tanto la humedad (60,8 - 62,2%), como la grasa (11,3% - 12,3%), no se afectaron por la formulación, ajustándose a lo establecido en el diseño experimental. Los niveles de cenizas en todas las muestras estuvieron muy próximos (3,3 - 3,6%). En cuanto al contenido energético las variaciones no fueron muy grandes, la salchicha de grasa animal obtuvo un contenido energético de 185,2 kcal/100 g mientras que las reformuladas variaron entre 176,6 kcal/100 g y las 194,2 kcal/100 g. Estas pequeñas variaciones se deben a diferencias en el contenido en grasa y proteína, siendo la grasa la responsable de un 60% del valor energético de las salchichas. La energía aportada por el aceite de oliva, linaza y pescado fue aproximadamente de 39, 32 y 14 kcal/100 g, respectivamente. Se puede afirmar por lo tanto que la reformulación de las salchichas no se tradujo en grandes cambios en cuanto a componentes mayoritarios se refiere.

El análisis de los componentes mayoritarios de los **patés** (apartado IV.1.4.: tabla 2) pone en evidencia que se alcanzó el objetivo de nivel de grasa, resultando del 30,8% para el paté control y valores cercanos al 15% para el resto de patés. La humedad también varió entre el paté control (50,1%) y el resto de patés (62,8 - 66,2%). Todos los productos tuvieron niveles de proteína cercanos al 13%, ligeramente mayores en los patés reformulados donde la sustitución del tocino de cerdo por la pre-emulsión fue total. Este hecho es debido al aporte proteico no solo de la carne y el hígado, sino del APS de la pre-emulsión. Atendiendo al contenido energético se observa una disminución en torno al 40% en los patés con el 15% de grasa (201,2 - 218,3 kcal/100 g) respecto al control del 30% en grasa (345,5 kcal/100 g). La combinación lipídica supuso cerca del 30% de la energía en los patés donde la sustitución fue parcial y sobre el 57% donde la sustitución fue total. Cabe destacar por una parte, la escasa variación de los componentes mayoritarios producida por la

reformulación de los patés y por otra, la importante disminución energética que supone la reducción de la grasa en el producto final.

V.2.2. Perfil lipídico

La reformulación de los productos cárnicos produjo importantes cambios en el perfil de ácidos grasos (apartado IV.1.2.: tabla 4, apartado IV.1.4.: tabla 3). La incorporación de la mezcla de aceites (oliva, linaza y pescado) como ingrediente en sustitución (total o parcial) del tocino de cerdo, disminuyó los niveles de AGS ($p < 0,05$) tanto en salchichas (**Figura 2**) como en patés (**Figura 3**), en los que la disminución se acusó más cuando la sustitución fue parcial. Dentro de los AGS, el ácido palmítico y esteárico vieron reducidos sus niveles, sin producirse variación significativa en los niveles del ácido mirístico. Aunque los AGS son considerados hipercolesterolémicos en su conjunto, son los ácidos palmítico y mirístico los que tienen mayor poder aterogénico, considerándose neutro al ácido esteárico (Hu, Manson, & Willett, 2001). Los niveles de AGM experimentaron un descenso ($p < 0,05$) con la reformulación (figuras 2 y 3), esta disminución fue más acusada en el caso de los patés donde la sustitución fue total. Cabe destacar que la utilización de aceite de oliva ha limitado dicho descenso, debido a la alta cantidad de AGM que poseen estos productos. Pese a ello, los niveles de AGM y ácido oleico en los patés reformulados fueron similares o incluso superiores a aquellos obtenidos por otros autores en diversas reformulaciones de productos cárnicos (D'Arrigo *et al.*, 2004; Echarte *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2008). La mayor diferencia producida en el perfil lipídico tras la reformulación fue el aumento del porcentaje de AGP ($p < 0,05$), siendo tres veces mayores en el caso de las salchichas y 2,5 o 4 veces mayores en el caso de los patés (sustitución parcial o total, respectivamente) al ser comparados con los productos control. Este aumento de AGP se debe fundamentalmente a la reducción de AGS (figuras 2 y 3). La sustitución de AGS mediante AGP es más efectiva en la reducción del colesterol sérico y el riesgo de padecer ECV, que la simple reducción de la cantidad de grasa (Hu *et al.*, 2001).

La cantidad total de AGP n-3 en los productos reformulados fue alrededor de 2,5 g/100 g (1,96 g ALA, 539 mg AGP n-3 de cadena muy larga) en las salchichas y 3,36 g/100 g (2,64 g ALA, 723 mg AGP n-3 de cadena muy larga) en los patés en los que la sustitución de tocino de cerdo fue total y 1,76 g/100 g en los que fue parcial. Los niveles de AGP n-3 para los productos en los que toda su grasa era de origen animal fueron 0,11, 0,33 y 0,16 g/100 g, para las salchichas, patés con el 30% de grasa y patés con el 15% de grasa, respectivamente. Mediante el consumo de los patés

reformulados se alcanzarían con facilidad las recomendaciones dietéticas de AGP n-3, estimadas entre 1,4 y 3 g/día o incluso superiores (EFSA, 2005; Garg *et al.*, 2006; Kolanowski *et al.*, 1999).

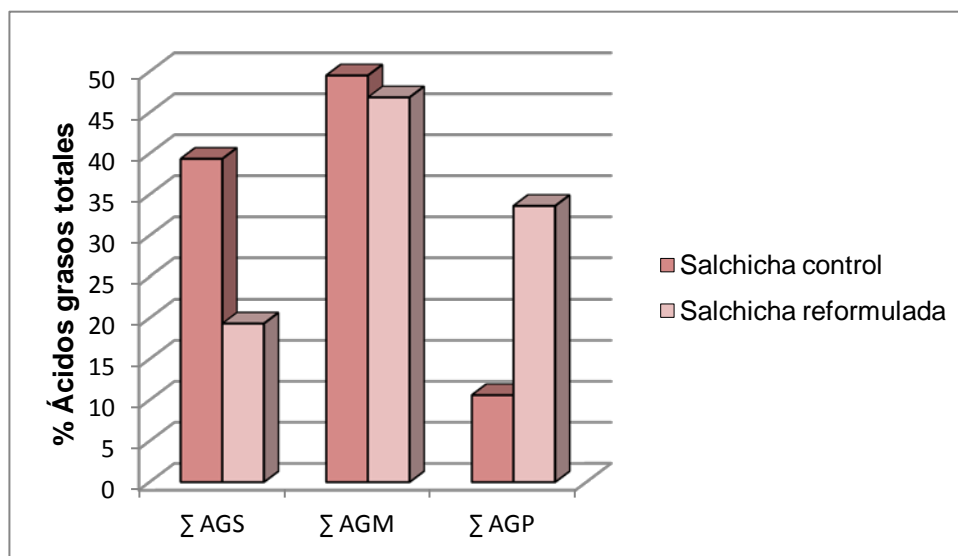


Figura 2. Comparación de grupos de ácidos grasos de una salchicha frankfurt control (grasa animal) frente a una salchicha frankfurt reformulada con la mezcla de aceites ricos en AGP n-3.

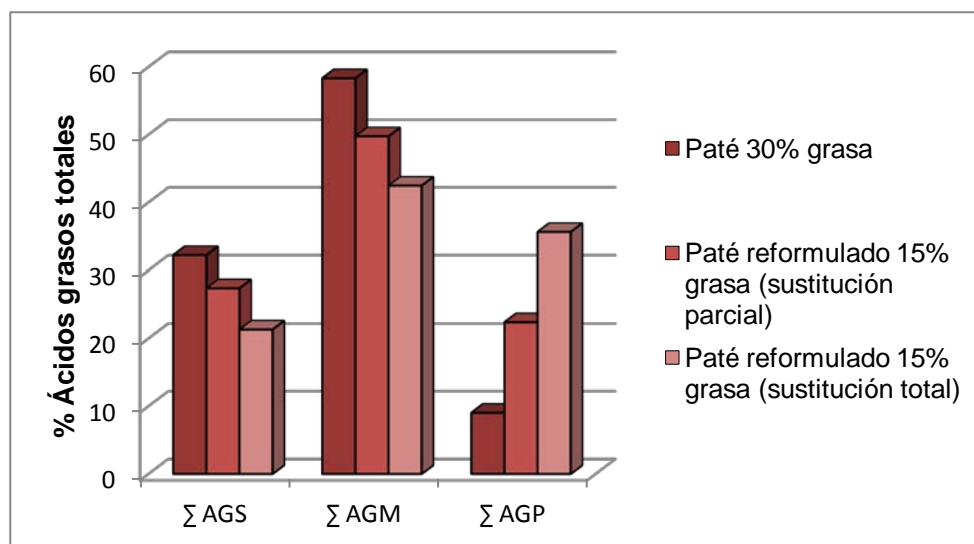


Figura 3. Comparación de grupos de ácidos grasos de un paté control (grasa animal) frente a patés donde se ha sustituido el tocino de cerdo (fuente de grasa animal) parcial y totalmente por una mezcla de aceites ricos en AGP n-3.

Por lo tanto, con la reformulación de las salchichas y los patés se ha conseguido un perfil lipídico más en línea con los objetivos nutricionales, disminuyendo el contenido en AGS mediante el incremento de AGP (incluyendo AGP n-3) sin apenas alterar el contenido en AGM (figuras 2 y 3), ajustándose a las recomendaciones de diversas organizaciones internacionales (EFSA, 2010; WHO, 2003).

La calidad nutricional de la fracción lipídica de los alimentos se puede evaluar mediante la **relación AGP/AGS**. Un aumento de este ratio puede conducir a una reducción del colesterol total en plasma, y por ello se está estudiando cómo aumentarlo en la carne y productos cárnicos (McAfee *et al.*, 2010). Tanto en salchichas como en patés esta relación se vió aumentada muy por encima de 0,4 (**Figuras 4 y 5**), valor que se marca como el mínimo recomendado (Wood *et al.*, 2004). En el caso de las salchichas la reformulación con la mezcla de aceites de origen vegetal y marino aumentó este ratio hasta el valor de 1,7, estando el valor de la salchicha control entorno a 0,3 (figura 4). En los patés donde la sustitución fue total se llegó hasta 1,67, mientras que con la sustitución parcial se obtuvo un valor de 0,82, siendo esta relación en el paté control de 0,28. Observando estos valores y la figura 5 se puede concluir que hay una relación directa entre el grado de sustitución y el incremento de la relación AGP/AGS.

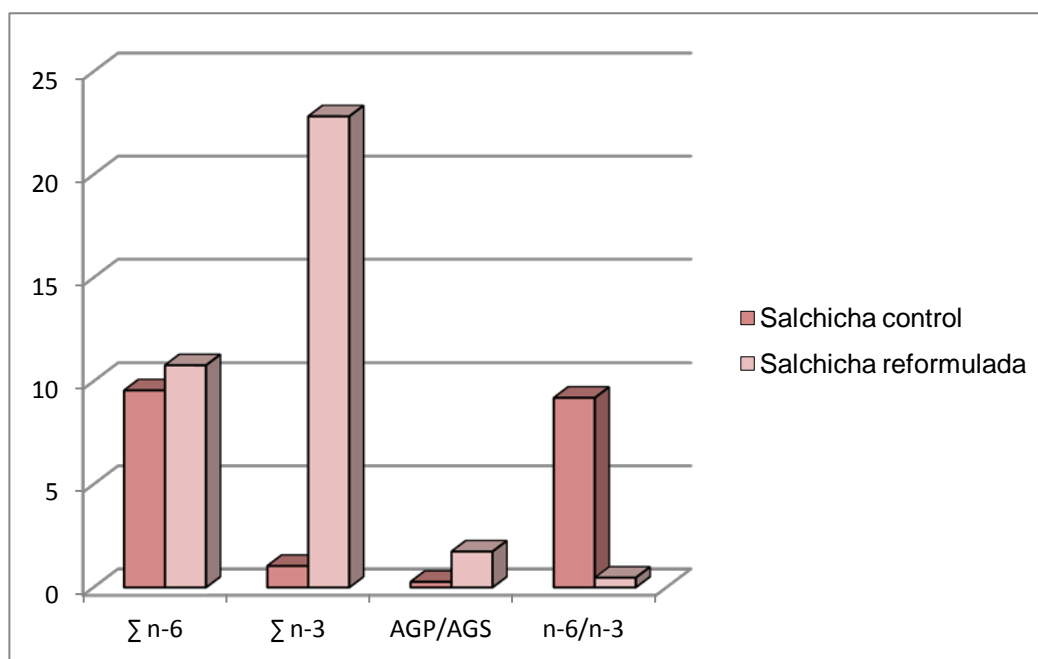


Figura 4. Comparativa de AGP n-6 y n-3 (en porcentaje sobre el total de ácidos grasos), así como de los índices de calidad AGP/AGS y n-6/n-3 en salchichas tipo frankfurt con toda su grasa proveniente de fuente animal frente a las reformuladas con la mezcla de aceites (oliva, linaza y pescado) rica en AGP n-3.

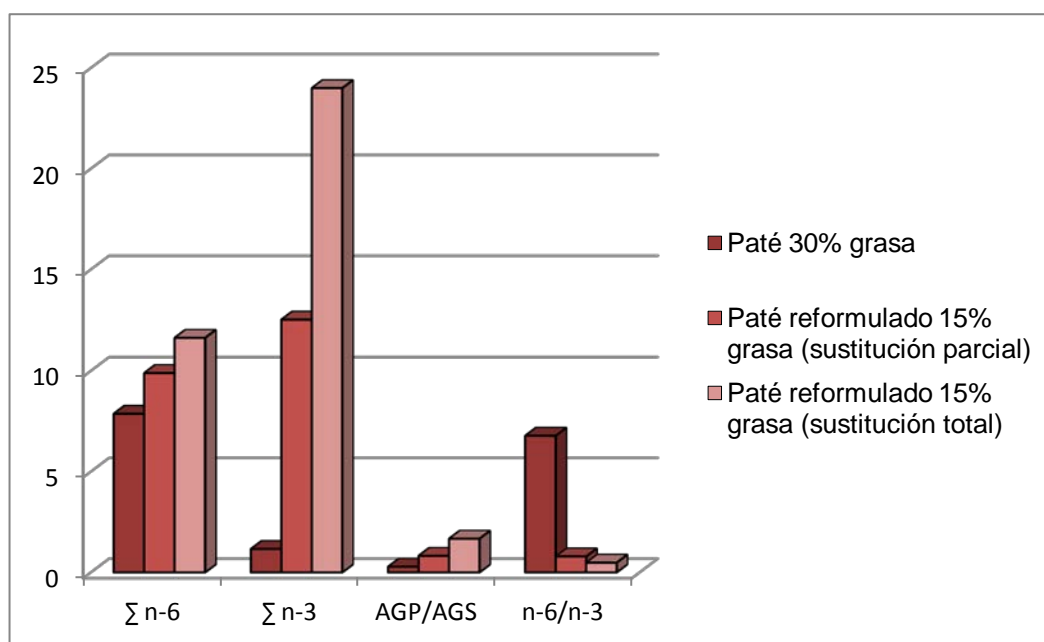


Figura 5. Comparativa de AGP n-6 y n-3 (en porcentaje sobre el total de ácidos grasos), así como de los índices de calidad AGP/AGS y n-6/n-3 en paté similar a los comerciales (30% grasa toda ella animal) frente a los reformuladas con la mezcla de aceites (oliva, linaza y pescado) rica en AGP n-3 en los que la sustitución del tocino de cerdo ha sido parcial y total.

Otro de los índices que evalúan la calidad lipídica de los alimentos es la **relación** entre los AGP **n-6 y n-3**. Se ha sugerido que valores muy altos de este índice inducen la patogénesis de muchas enfermedades (ECV, cáncer, etc.), mientras que un incremento de los niveles de AGP n-3 (y por ende un valor bajo de n-6/n-3) ejerce un efecto supresor (Simopoulos, 2002). Tras la reformulación de las salchichas y patés mediante la sustitución total del tocino de cerdo por la mezcla de aceites, el valor de este índice disminuyó ($p < 0,05$) de 9,2 a 0,5 en las salchichas y de 6,8 a 0,5 en los patés (figuras 4 y 5). En el caso de la sustitución parcial en los patés, esta relación disminuyó hasta el 0,8, debido, fundamentalmente, al gran aumento de los AGP n-3 y no tanto a los niveles de AGP n-6 (figura 5). Las recomendaciones de la EFSA y de la Agencia de Estándares de Alimentos de Reino Unido (UK Food Standards Agency) siguen la pauta de no establecer valores específicos para el índice n-6/n-3 sino establecer criterios de ingestas adecuadas para ácido linoleico, ALA, EPA y DHA (Stanley *et al.*, 2007; EFSA 2010). Atendiendo a estas recomendaciones se observa un aumento significativo en los AGP n-3 ALA, EPA y DHA, con un pequeño aumento de la principal fuente de AGP n-6, el ácido linoleico.

También se midió el **índice aterogénico** (IA) y **trombogénico** (IT) (Ulbricht & Southgate, 1991) produciéndose una disminución ($p < 0,05$) de ambos con la reformulación, debido fundamentalmente a la disminución de los AGS y el aumento de los AGP (figuras 4 y 5).

De lo anteriormente expuesto se desprende que se han alcanzado los objetivos de mejora del perfil lipídico, disponiendo de unos productos cárnicos más en línea con las recomendaciones nutricionales de diversas instituciones.

V.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO FUNCIONAL

Estudios epidemiológicos han evidenciado que las grasas saturadas y las grasas *trans* aumentan el riesgo de enfermedad coronaria (Hu *et al.*, 2001; Kromhout *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2011) y que frecuentemente está asociado con el consumo de productos cárnicos y alimentos procesados (Sinha *et al.*, 2009; WHO, 2003). La sustitución de la grasa saturada por grasa monoinsaturada o poliinsaturada parece reducir el riesgo, siendo más evidente el efecto con la sustitución por AGP (Astrup *et al.*, 2011; Bhupathiraju & Tucker, 2011; Jakobsen *et al.*, 2009). El consumo de aceite de oliva reduce la concentración de LDL-colesterol cuando se compara con AGS, contiene una gran cantidad de antioxidantes en relación a su contenido en AGP y puede reducir el desarrollo de aterosclerosis coronaria (Ruiz-Canela & Martínez-González, 2011). El aceite de linaza contiene una gran cantidad de ácido α -linolénico, al que se le reconocen beneficios sobre los niveles de colesterol, reduciendo el colesterol total y el LDL-colesterol sin afectar al HDL-colesterol (Lunn & Theobald, 2006). Los AGP n-3, EPA y DHA, presentes en el aceite de pescado tienen efectos cardioprotectores, ya que poseen potentes efectos antiarrítmicos, mejoran la función vascular endotelial y ayudan a disminuir la tensión arterial, sensibilidad plaquetaria y niveles de triglicéridos (Wijendran & Hayes, 2004). Estos tres aceites son los que han sido utilizados en el desarrollo de los productos cárnicos con el perfil lipídico optimizado. Una vez analizadas sus características nutricionales y tecnológicas y no encontrándose problemática en cuanto a estabilidad y aceptación sensorial, se puso en marcha el diseño de un estudio de intervención en humanos para evaluar los posibles efectos beneficiosos (funcionales) que esta mejora del perfil lipídico pudiera causar en la salud de consumidores con factores elevados de riesgo cardiovascular.

V.3.1. Marcadores e índices de ECV

El beneficio buscado con el consumo de los productos cárnicos funcionales desarrollados es la disminución del riesgo cardiovascular. Ya se ha desarrollado más en profundidad la importancia de la ECV, sus factores de riesgo y su relación con la dieta (apartado I.1.3.2.) y también se ha hablado de los marcadores de riesgo de la ECV (apartado I.3.1.2.). La modificación del perfil lipídico conseguida en los productos cárnicos reformulados, aporta una importante cantidad de AGM y AGP (sobre todo n-3) (apartado V.1.2.2.2.) que pueden tener la capacidad de mejorar los niveles de colesterol y lipoproteínas (apartado I.1.3.2.). Por ello se valorarán biomarcadores de riesgo de ECV asociados con el metabolismo lipídico y lipoproteico.

Los sujetos diana que podrían beneficiarse con el consumo de los productos desarrollados en esta memoria, son aquellos que se encuentren en riesgo cardiovascular por alteración de lípidos o lipoproteínas séricas y sobrepeso/obesidad. Se establecieron una serie de criterios de inclusión, todos ellos indicativos de riesgo cardiovascular:

- Nivel de colesterol total superior a 200 mg/dl
- Nivel de LDL-colesterol superior a 110 mg/dl
- Índice de Masa Corporal (IMC) entre 25 y 34,9 kg/m²

Además, se consideró criterio de exclusión el tener diabetes o cualquier otra enfermedad crónica que pudiese afectar al metabolismo lipídico. Como variables a medir se establecieron la concentración sérica de colesterol total, LDL y HDL colesterol, triglicéridos y LDL oxidada. Es innegable la importancia de la medición del colesterol total cuando se trata de establecer el riesgo de ECV, ya que este parámetro es uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de esta enfermedad (WHO, 2009). Pero como biomarcador, la medida del colesterol total resulta insuficiente, ya que no interesa que en caso de disminución ésta se produzca a expensas de la fracción HDL-colesterol. Es por ello por lo que resulta necesario extender la valoración de los niveles de colesterol a su metabolismo lipoproteico asociado. Los niveles de HDL- y LDL-colesterol también son indicativos de riesgo de ECV, ya que valores disminuidos del primero y aumentados del segundo se relacionan con enfermedades coronarias (Baigent *et al.*, 2005; Castelli, 1988). Así pues, la utilización del índice LDL-colesterol/HDL-colesterol puede resultar adecuada para la medición de variación del riesgo. Castelli (1988) propuso un índice de aterogénico basado en la relación colesterol total/HDL-colesterol, se ha encontrado una relación dosis-respuesta entre el propio índice y la mortalidad total (Mensink, Zock *et al.*, 2003).

Hay que tener en cuenta también, además de la cantidad de colesterol transportado por las partículas, que la densidad, tamaño y oxidación de las mismas afectan al riesgo de ECV. Partículas LDL pequeñas y densas son altamente aterogénicas, y altos niveles de LDL oxidada aumentan el riesgo de ECV (Carmena, Duriez, & Fruchart, 2004). El índice de aterogenicidad de las LDL, calculado mediante la relación molar de triglicéridos/HDL-colesterol, está relacionado con el tamaño de partícula de HDL y LDL y diversos estudios lo relacionan con el desarrollo de ECV (Boizel *et al.*, 2000; Dobiasova, Frohlich, Sedova, Cheung, & Brown, 2011; Soska *et al.*, 2012).

La complejidad y heterogeneidad de los procesos de ECV hace imposible que el uso de un único biomarcador sea suficiente como predictor del desarrollo de la misma, por ello se hace necesario la utilización de más de un biomarcador para evaluar los procesos de origen y desarrollo de ECV en el contexto de la nutrición. Además de los parámetros séricos y los diversos índices expuestos, también se midieron otros parámetros relacionados con la ECV como fueron el IMC, diversos perímetros y pliegues subcutáneos, bioimpedancia y tensión arterial sistólica y diastólica.

A raíz de lo expuesto, resulta importante para la investigación clínica y nutricional, conocer los niveles de diferentes variables relacionadas con la ECV, como arilesterasa, tromboxanos, prostaciclina, 8-oxo-deoxi-guanosina, isoprostanos, LDL-oxidada y agregación plaquetaria. Estos parámetros poseen, además de una alta variabilidad analítica, una elevada variabilidad inter e incluso intraindividual, por lo que un conocimiento más amplio del comportamiento de las mismas en distintos tipos de sujetos contribuirá a establecer intervalos de referencia y mejorar la fiabilidad metodológica. Unidos a estos parámetros también se analizaron otros de uso clínico, como son la glucosa e insulina y otros utilizados en diagnósticos más específicos como son las Apo I, ApoB y la PCR de alta sensibilidad. El estudio de todas estas variables está siendo objeto de otra tesis doctoral en curso.

V.3.2. Diseño del estudio de intervención

Para valorar el posible efecto funcional del consumo de productos cárnicos con el contenido lipídico optimizado, en base a las recomendaciones de ingesta, en una población diana en riesgo cardiovascular, se diseñó un estudio de intervención cruzado y controlado en sujetos con dos factores de riesgo de ECV. Se utilizaron como productos cárnicos control, salchichas y patés de composición similar a los

comerciales. Los sujetos en estudio tenían que reunir al menos dos factores de riesgo de ECV de los tres incluidos en los criterios de inclusión comentados en el apartado anterior: nivel de colesterol total superior a 200 mg/dl, nivel de LDL-colesterol superior a 110 mg/dl e IMC entre 25 y 34,9 kg/m². Las variables principales del estudio fueron parámetros de uso clínico como colesterol total, LDL y HDL colesterol y triglicéridos, y también una medida de la oxidación de las LDL. Finalmente, el tiempo de intervención con los productos fue de cuatro semanas ya que según la bibliografía es suficiente para obtener una modificación en el perfil dietético mediante cambios dietéticos (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2008).

Como productos cárnicos control, se prepararon unos productos con composición similar a los que se encuentran en el mercado, salchichas tipo frankfurt con un contenido en grasa del 18% y patés con un contenido en grasa del 30%, toda ella de origen animal. Para los productos cárnicos reducidos en grasa se optó por utilizar salchichas y patés con un contenido en grasa del 15%, toda ella de origen animal. Los productos cárnicos funcionales elegidos para llevar a cabo este estudio, fueron los expuestos en esta memoria con ligeras modificaciones. Se utilizaron salchichas tipo frankfurt con un contenido graso del 15% donde toda la grasa animal fue sustituida por la combinación de aceites de origen vegetal y marino propuesta (apartado V.1.1.1.) en forma de pre-emulsión, utilizando el CS como estabilizador proteico debido a sus mejores resultados organolépticos (apartado V.1.2.1.1.). Este aumento de grasa (12 al 15%) respecto a las salchichas desarrolladas y estudiadas con anterioridad se debe a la necesidad de incrementar el consumo de componentes bioactivos (AGP n-3) para facilitar la valoración de los posibles efectos beneficiosos, sin aumentar la cantidad de ingesta de salchichas. En el caso de los patés potencialmente funcionales se utilizaron los patés desarrollados en los estudios previos, con un 15% de grasa donde la grasa animal fue totalmente sustituida por una pre-emulsión (de aceite en agua) de una combinación de aceites de oliva, linaza y pescado, utilizando APS como estabilizador proteico.

Se determinó que el estudio se iba a dividir en tres periodos de cuatro semanas cada uno y dos periodos de lavado de otras cuatro semanas entre ellos. En cada periodo los voluntarios consumieron 800g de salchichas y 1kg de paté del tipo de producto cárnico correspondiente (comercial, reducidos en grasa, funcional). Como se puede apreciar en la **Tabla 1** las principales diferencias de aporte nutricional tienen lugar en cuanto a cantidad y tipo de ácidos grasos aportados. La reducción de grasa total consumida con los productos cárnicos funcionales y los reducidos en grasa respecto a los productos comerciales es de un 40%, mientras que la reducción calórica se queda en torno a un 30%. A destacar la importante cantidad de AGP n-3 aportada

por los productos cárnicos potencialmente funcionales 2,3 g/día, de los cuales aproximadamente 0,43 g son aportados por EPA y DHA, cuando las recomendaciones nutricionales para AGP n-3 oscilan entre 1,4 y 3 g/día (EFSA, 2005; Garg *et al.*, 2006; Kolanowski *et al.*, 1999) y para AGP n-3 de cadena larga entre 180-1000 mg/día (EFSA 2005, 2010; Garg *et al.*, 2006).

El reclutamiento de sujetos para participar en el estudio fue complicado debido a la escasa respuesta a los anuncios del estudio, a pesar de que se realizó una extensa propaganda. Los productos cárnicos funcionales despertaron escaso interés si se compara con estudios similares, pero con otros alimentos, ya que también se observó una limitada respuesta en un estudio del grupo con productos cárnicos funcionales enriquecidos con nuez (Olmedilla-Alonso *et al.*, 2008). Además, la larga duración del mismo supuso otro verdadero hándicap a la hora de encontrar sujetos dispuestos a participar en el estudio. Finalmente y tras varios meses de anuncios y búsqueda, se consiguió reunir el tamaño muestral que se necesitaba, 22 sujetos.

Tabla 1. Aporte nutricional diario de los productos cárnicos del estudio de intervención

	Productos cárnicos comerciales	Productos cárnicos reducción grasa	Productos cárnicos funcionales
Proteína (g/día)	9,9	9,9	10,6
Grasa (g/día)	16,1	9,8	9,9
% del total de ácidos grasos			
AGS	35,5	35,5	20,4
Ácido palmítico	21,8	21,8	12,6
Ácido esteárico	11,6	11,6	5,7
AGM	54,4	54,4	44,5
Ácido oleico	46,9	46,9	39,7
AGP	9,7	9,7	34,7
Ácido linoleico	7,9	7,9	11,2
Ácido α -linolénico	0,5	0,5	17,6
EPA	-	-	2,7
DHA	-	-	1,8
Total AGP n-3 (g/día)	0,1	0,1	2,3
Energía (kcal/día)	191,6	133,4	137,6

V.3.3. Efecto funcional de los productos

Los resultados del estudio de intervención en humanos quedan recogidos en el apartado IV.2.1. de esta memoria; en este punto simplemente recalcar algunos de los resultados más importantes del mismo.

Las concentraciones basales de las variables analíticas objeto de estudio no fueron diferentes al inicio de cada uno de los tres periodos de estudio, por ello, como valor basal se calculó la media de los correspondientes al inicio de cada período (apartado IV.2.1.: Tabla 1). Comparando los niveles basales de los lípidos séricos con los de después del consumo de las salchichas y los patés reformulados con su perfil lipídico optimizado, se encontró un descenso de 7 mg/dl ($p < 0,05$) de LDL-colesterol, sin variar los niveles de LDL oxidadas ni de ningún otro parámetro. Este descenso se asocia con una disminución del riesgo de ECV de aproximadamente un 7% (Rahilly-Tierney, Lawler, Scranton, & Gaziano, 2009). El consumo de los productos con su contenido graso reducido no causó ningún efecto, respecto a los valores basales de los parámetros estudiados. Sin embargo, tras el consumo de los productos comerciales los valores de LDL-colesterol y LDL oxidadas se vieron aumentados ($p < 0,05$) respecto a su valor basal (8,4 mg/dl y 7,5 U/l, respectivamente).

Aunque resulta complicado establecer el papel de cada aceite en esta modificación de los niveles de LDL-colesterol, se encontró que un estudio en otra matriz alimentaria, la leche, modificada con niveles semejantes de ácido oleico y EPA+DHA arrojó resultados similares (Baró *et al.*, 2003). Además en una revisión sistemática de 14 estudios (de un mínimo de 4 semanas de duración), se concluyó que el ácido α -linolénico no modificaba los lípidos sanguíneos (Wendland *et al.*, 2006). Es por lo tanto, que la combinación de aceite de oliva y AGP n-3 de cadena muy larga pudo ser la responsable del efecto en los lípidos sanguíneos.

Llama la atención que no se vieran modificados los niveles de triglicéridos tras el consumo de los productos cárnicos funcionales. Era esperable una reducción de los niveles de los triglicéridos, ya que diversos estudios indican que los AGP n-3 y el aceite de pescado disminuyen los triglicéridos séricos (Harris, Miller, Tighe, Davidson, & Schaefer, 2008; Kris-Etherton, Harris, Appel, & Nutrition, 2002). Una posible explicación a este hecho puede ser la baja concentración basal de triglicéridos en los voluntarios y la alta variabilidad entre ellos, además de que otros constituyentes de los productos cárnicos pudieran haber jugado un papel en el mismo.

Atendiendo a los cambios relativos que cada tipo de producto ejerció sobre los valores de los parámetros estudiados, se encuentran resultados destacables (apartado IV.2.1.: figura 1). Comparando el consumo de los productos cárnicos potencialmente

funcionales con los comerciales, se observa una disminución de los niveles de colesterol total, LDL- y HDL-colesterol (0,5%, 11,8%, 2,1%, respectivamente), aunque solo fue significativo el descenso en LDL colesterol. La evidencia científica asume que la sustitución de AGS por AGM o AGP, lleva a una reducción del colesterol total y del LDL colesterol (Mensink & Katan, 1992). Pero también existe evidencia suficiente que muestra que los AGP aumentan la susceptibilidad a la oxidación de las LDL comparadas con los AGM, principalmente debido a su mayor grado de insaturación (Bhupathiraju & Tucker, 2011). Valores elevados de LDL oxidadas pueden utilizarse como indicador temprano de ECV, ya que ha mostrado ser un predictor independiente de la ocurrencia de placa de ateroma aterosclerótica (Palomaki *et al.*, 2010). En nuestro estudio de intervención tanto tras el consumo de los productos cárnicos reducidos en grasa como en los productos cárnicos funcionales, los niveles de LDL oxidadas descendieron significativamente respecto al consumo de productos cárnicos comerciales en un 14,5% y un 17,3% respectivamente. Por lo tanto parece que la reducción de grasa fue un factor importante en la disminución de los niveles de LDL oxidadas. Comparando los efectos del consumo de los productos con su contenido graso reducido y los productos cárnicos funcionales, se encuentra que el consumo de salchichas y patés reformulados disminuyen tanto los niveles de LDL-colesterol (4,7%) como los de LDL oxidadas (2,8%) aunque de manera no significativa. A esta pequeña reducción de los niveles de LDL oxidadas podrían haber contribuido los componentes antioxidantes del aceite de oliva, como el hidroxitiroso, en el que se ha encontrado que reduce la oxidación de las LDL (Vázquez-Velasco *et al.*, 2011).

En la actualidad, diferentes relaciones e índices de las fracciones lipídicas se han venido utilizando como indicadores de reducción de ECV. En este estudio de intervención solo se observó una ligera disminución de la relación LDL-colesterol/HDL-colesterol (0,14, $p < 0,1$) tras el consumo de los productos cárnicos potencialmente funcionales. Cuesta *et al.*, (1998) no encontraron modificaciones en el cociente CT/HDL-colesterol o en el de LDL-colesterol/HDL-colesterol al sustituir en la dieta un 8% de AGM por AGP, debido a que los AGS incrementan tanto los niveles de LDL como de HDL (Mensink y Katan, 1992; Cuesta *et al.*, 1998).

En cuanto a variaciones en la tensión arterial se observó un ligero incremento en la tensión arterial diastólica tras el consumo de los productos cárnicos comerciales (3,1 mm Hg, $p < 0,1$) y un pequeño descenso de la tensión arterial sistólica (2,4 mm Hg, $p < 0,1$) tras el consumo de los productos cárnicos funcionales. En el estudio, los valores de tensión arterial generalmente permanecieron por debajo de los valores definitorios de hipertensión, 140 / 90 mm Hg.

Se considera, por lo tanto, que el consumo de los productos cárnicos funcionales desarrollados en este estudio tuvo un efecto funcional en el grupo de voluntarios con riesgo de ECV, mediante la reducción de LDL-colesterol y el no incremento de las LDL oxidadas. El consumo de cualquier producto cárnico del estudio (comercial, reducido en grasa, funcional) no produjo ningún cambio significativo en los niveles de colesterol total o tensión arterial. Asimismo, los productos cárnicos similares a los comerciales, una vez consumidos, provocaron un aumento de los niveles de LDL-colesterol y LDL oxidadas, y por tanto el riesgo de ECV. Las causas de estos cambios en los lípidos séricos pueden deberse fundamentalmente a la cantidad de grasa y al perfil lipídico de los productos, debido a que es lo único que varía sustancialmente (Tabla 1), ya que los sujetos incluyeron este tipo de alimentos en su dieta habitual y se les pidió que no modificasen sus hábitos alimentarios.

En comparación con productos cárnicos comerciales, puede concluirse que el consumo de productos cárnicos reformulados con una combinación de aceites (oliva, linaza y pescado) reduce los niveles de LDL-colesterol y LDL oxidadas, así como la relación LDL-colesterol/HDL-colesterol. El desarrollo de productos cárnicos con su contenido en grasa reducido (con o sin modificación de su perfil lipídico) parece ser una buena estrategia para contribuir a reducir el riesgo de ECV entre los consumidores de carne. Aunque no se alcanza un nivel de significación estadística es probable que la modificación del perfil lipídico de los mismos ejerza aún mayores beneficios sobre la salud, casi el 67% de los voluntarios tenían sus niveles de LDL-colesterol por encima de 130 mg/dl y tras el consumo de los productos cárnicos con el perfil lipídico optimizado el porcentaje se redujo al 38% ($p=0,064$). Para verificar que la muestra de sujetos en la que se ha observado el efecto funcional es representativa de la población con riesgo cardiovascular, y poder así generalizar resultados, se deberán realizar más estudios de intervención con este tipo de productos.

V.4. DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DE PROPIEDADES SALUDABLES

De acuerdo con la propuesta de regulación de las declaraciones nutricionales concernientes a AGP n-3, AGM, AGP y ácidos grasos insaturados de los alimentos en Europa (EFSA, 2005), las salchichas y los patés reformulados del estudio pueden contener la alegación de tener un *alto contenido en ácidos grasos omega-3* ya que contienen más del 30% de la ingesta nutricional recomendada (2 g/día para un hombre adulto) de AGP n-3 por cada 100 g de producto. Según el Reglamento (UE) N°

116/2010 de la Comisión por el que se modifica el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, la alegación de *alto contenido en ácidos grasos omega-3* sólo puede ser realizada cuando el producto contenga un mínimo de 0,6 g ALA/100g o un mínimo de 80 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g, valores que los productos desarrollados en esta memoria cumplen. En este mismo Reglamento también aparece la alegación de *alto contenido en grasas insaturadas*, que tanto las salchichas como los patés con perfil lipídico optimizado podrían llevar en su etiquetado. Sin embargo, solo las salchichas reformuladas podrían llevar la alegación de *alto contenido en grasas monoinsaturadas*, ya que los patés no contienen el 45% de AGM necesarios para que puedan considerarse con alto contenido (**Tabla 2**)

Concerniente a los AGP n-3 la EFSA ha propuesto como ingesta adecuada de ALA un 0,5% del total de la energía diaria. Mediante el consumo de unos 30 g de las salchichas reformuladas y unos 35 g de los patés al día (200 y 250 g a la semana respectivamente) la energía aportada por ALA de estos productos alcanzaría el 0,78% de la dieta, considerando una dieta media de 2000 kcal. El consumo de esta misma cantidad de salchichas tipo frankfurt y patés reformulados aportarían 0,43 g de EPA+DHA al día, casi los 500 mg/día recomendados por la Sociedad Internacional para el Estudio de los Lípidos y los Ácidos Grasos (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL) (Kris-Etherton, Grieger, & Etherton, 2009) y cumpliendo la ingesta adecuada de 250 mg/día establecida por la EFSA (2010).

Además de todas estas alegaciones nutricionales, recientemente ha aparecido un nuevo Reglamento de la UE en el que se establece una lista de las declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos (Reglamento (CE) Nº 432/2012). En la **Tabla 3** se recogen las declaraciones que pueden emplearse tanto en las salchichas como en los patés reformulados en este estudio concernientes a los cambios en su perfil lipídico.

Tabla 2. Declaraciones nutricionales autorizadas para las salchichas (15% grasa) y patés (15% grasa) reformulados en el estudio. Adaptado del Reglamento (CE) 1924/2006

Producto cárnico (valor en relación con las condiciones de uso)	Declaración	Condiciones de uso
Patés (39%)	Valor energético reducido	Solamente podrá declararse que un alimento posee un valor energético reducido si el valor energético se reduce, como mínimo, en un 30 %, con una indicación de la característica o características que provocan la reducción del valor energético total del alimento
Salchichas (37%) Patés (27%)	Fuente de proteínas	Solamente podrá declararse que un alimento es fuente de proteínas si las proteínas aportan como mínimo el 12% del valor energético del alimento.
Salchichas (37%) Patés (27%)	Alto contenido de proteínas	Solamente podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de proteínas si las proteínas aportan como mínimo el 20 % del valor energético del alimento
Salchichas -2,6 g/100 g ALA -650 mg/100 g EPA+DHA Patés -2,7 g ALA -697 mg/100 g EPA+DHA	Fuente de ácidos grasos omega 3	Solamente podrá declararse que un alimento es fuente de ácidos grasos omega-3 si el producto contiene al menos 0,3 g de ácido alfa-linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 40 mg de la suma de ácido eicosapentaenoico y ácido decosahexaenoico por 100 g y por 100 kcal.
Salchichas -2,6 g/100 g ALA -650 mg/100 g EPA+DHA Patés -2,7 g/100 g ALA -697 mg/100 g EPA+DHA	Alto contenido de ácidos grasos omega 3	Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de ácidos grasos omega-3 si el producto contiene al menos 0,6 g de ácido alfa-linolénico por 100 g y por 100 kcal, o al menos 80 mg de la suma de ácido eicosapentaenoico y ácido decosahexaenoico por 100 g y por 100 kcal.
Salchichas (47% / 29%)	Alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados	Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas monoinsaturadas si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas monoinsaturadas y las grasas monoinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.
Salchichas (80% / 51%) Patés (78% / 52%)	Alto contenido de grasas insaturadas	Solamente podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas poliinsaturadas si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas poliinsaturadas y las grasas poliinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

Tabla 3. Declaraciones de propiedades saludables autorizadas para las salchichas (15% grasa) y patés (15% grasa) reformulados en el estudio. Adaptado del Reglamento (CE) N° 423/2012

Compuesto	Declaración	Condiciones de uso
<p>Ácido α-linolénico</p> <p>Salchichas: 2,6 g/100 g</p> <p>Patés: 2,7 g/100 g</p>	<p>El ácido α-linolénico contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo</p>	<p>Solo aplicable a alimentos que como mínimo son fuente de ácido α-linolénico de acuerdo con la declaración de FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.</p> <p>Hay que informar que el efecto beneficioso se conseguirá con una ingesta diaria de 2 g de este ácido graso</p>
<p>Ácido docosahexaenoico (DHA)</p> <p>Salchichas: 257 mg/100 g</p> <p>Patés: 279 mg/100 g</p>	<p>El ácido docosahexaenoico contribuye a mantener el funcionamiento normal del cerebro</p> <p>El ácido docosahexaenoico contribuye al mantenimiento de la visión en condiciones normales</p>	<p>El alimento debe contener al menos 40mg de DHA por 100 g y por 100 kcal. Debe informarse al consumidor que el beneficio se obtiene con una ingesta diaria de 250 mg de DHA</p>
<p>Ácido eicosapentaenoico(EPA)</p> <p>Ácido docosahexaenoico (DHA)</p> <p>Salchichas: 650 mg/100 g</p> <p>Patés: 697 mg/100 g</p>	<p>Los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico contribuyen al funcionamiento normal del corazón</p>	<p>Solo aplicable a alimentos que como mínimo son fuente de EPA y DHA según la declaración de FUENTE DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.</p> <p>Debe informarse al consumidor que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 250 mg de EPA y DHA.</p>
<p>Ácido oleico</p> <p>Salchichas: 6,4 g/100 g</p> <p>Patés: 5,8 g/100 g</p>	<p>La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo. El ácido oleico es una grasa insaturada</p>	<p>Solo puede utilizarse en alimentos con alto contenido en ácidos grasos insaturados de acuerdo a la declaración de ALTO CONTENIDO EN GRASAS INSATURADAS que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.</p>
<p>Ácidos grasos monoinsaturados (AGM) o poliinsaturados (AGP)</p> <p>Salchichas: 12,2 g/100 g</p> <p>Patés: 12,1 g/100 g</p>	<p>La sustitución de grasas saturadas por grasas insaturadas en la dieta contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo (los AGM y AGP son grasas insaturadas)</p>	<p>Solo puede utilizarse en alimentos con alto contenido en ácidos grasos insaturados de acuerdo a la declaración de ALTO CONTENIDO EN GRASAS INSATURADAS que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.</p>

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La formación de emulsiones de aceite en agua (O/W) supone una estrategia adecuada para la estabilización de combinaciones de aceites de origen vegetal (oliva y linaza) y marino (pescado), especialmente diseñados en base a su contenido y perfil lipídico para ser empleados como ingredientes bioactivos en la formulación de productos cárnicos. La utilización de diversos sistemas proteicos basados en el empleo de caseinato sódico, aislado de proteína de soja, transglutaminasa y proteína cárnica como agentes emulsionantes, permite la formación de matrices con un contenido lipídico conveniente (a nivel cuantitativo y cualitativo) y características adecuadas para ser utilizadas como sustitutos en productos cárnicos convencionales.
2. La sustitución parcial de la grasa animal por emulsiones O/W preparadas con una combinación de aceites (de origen vegetal y marino) y diferentes sistemas proteicos resulta una estrategia adecuada para desarrollar salchichas tipo frankfurt potencialmente funcionales en base a un contenido lipídico mejorado. Dicha estrategia además de aportar un nivel reducido de grasa, ha permitido dotar al producto de concentraciones limitadas de ácidos grasos saturados (19% del total de ácidos grasos) y proporciones elevadas de ácidos grasos poliinsaturados (34% del total de ácidos grasos), incluyendo ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena muy larga (539 mg/100 g).
3. La estrategia de reformulación ensayada en el desarrollo de salchichas tipo frankfurt para dotarles de efectos potencialmente saludables, si bien condiciona diversas características de las mismas (microestructura, textura, propiedades sensoriales, etc.), permite la obtención de productos con adecuada viabilidad tecnológica, sensorial y microbiológica, sin limitaciones, en términos de seguridad o vida útil, adicionales a las de un derivado cárnico de naturaleza análoga.
4. El proceso de reformulación encaminado al desarrollo de paté potencialmente funcional en base a un contenido lipídico mejorado (reducción de grasa y enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados n-3), se pudo conseguir mediante la sustitución de tocino de cerdo por una emulsión de aceites de oliva, linaza y pescado en agua e inclusión del gel de konjac, dando lugar a un producto con un 50% menos de grasa y con elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados n-3, incluyendo 723 mg/100 g de ácidos grasos n-3 de cadena muy larga.

5. El proceso de reformulación ensayado en el desarrollo de los patés afectó a las propiedades reológicas, tecnológicas, sensoriales, etc. de los nuevos productos, estando asociado tal comportamiento a cambios realizados en relación con la presencia de agua, aceites y el gel de konjac. El paté obtenido, además de ventajas desde el punto de vista de su composición, presenta adecuada viabilidad tecnológica, sensorial y microbiológica, incluso en periodos prolongados de conservación en refrigeración.

6. La estrategia de reformulación llevada a cabo en salchichas tipo frankfurt y patés, supone que los nuevos productos exhiban una composición lipídica más acorde con las recomendaciones de ingesta de ácidos grasos establecidas por organismos internacionales como WHO (2003) y EFSA (2010). Al respecto, tanto las salchichas tipo frankfurt como los patés se ajustan a la declaración de *alto contenido en ácidos grasos omega-3* y *alto contenido en grasas insaturadas*, según lo estipulado en el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

7. La inclusión en la dieta de estos productos cárnicos formulados con un menor contenido graso y con perfil lipídico optimizado (mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-3), da lugar a una disminución de la concentración de LDL-colesterol en sujetos con riesgo cardiovascular elevado. Para verificar que la muestra de sujetos en la que se ha observado el efecto funcional es representativa de la población con riesgo cardiovascular, y poder así generalizar resultados, se deberán realizar más estudios de intervención con este tipo de productos.

Conclusión general

A través de la estrategia de reformulación planteada, se pueden elaborar productos cárnicos saludables, de contenido graso reducido, estables, con propiedades físico-químicas y organolépticas adecuadas y con un perfil lipídico optimizado de acuerdo a los objetivos nutricionales actuales. La ingesta de estos productos dentro de la dieta habitual produce efectos funcionales, ya que mejora los niveles de algunos biomarcadores de riesgo cardiovascular en los consumidores.

VII. REFERENCIAS

VII. REFERENCIAS

- AESAN/MARM. (2011). Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.
- Aggett, P.J., Antoine, J.M., Asp, N.G., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J.H., Howlett, J., Muller, D.J.G., Persin, C., Pijls, L.T.J., Rechkemmer, G., Tuijelaars, S., & Verhagen, H. (2005). PASSCLAIM - Consensus on criteria. *European Journal of Nutrition*, 44, 5-30.
- Akesowan, A. (2008). Effect of soy protein isolate on quality of light pork sausages containing konjac flour. *African Journal of Biotechnology*, 7(24), 4586-4590.
- Aksu, M.I. (2007). The effect of alpha-tocopherol, storage time and storage temperature on peroxide value, free fatty acids and pH of kavurma, a cooked meat product. *Journal of Muscle Foods*, 18(4), 370-379.
- Alaejos, M.S., González, V., & Afonso, A. M. (2008). Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: A review. *Food Additives and Contaminants*, 25(1), 2-24.
- Alexander, D.D., Morimoto, L.M., Mink, P.J., & Cushing, C.A. (2010). A review and meta-analysis of red and processed meat consumption and breast cancer. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 349-365.
- Alexander, D.D., Weed, D.L., Cushing, C.A., & Lowe, K. A. (2011). Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 20(4), 293-307.
- Ambrosiadis, I., Theodorakakos, N., Georgakis, S., & Lekkas, S. (1994). Influence of thawing methods on the quality of frozen meat and the drip loss. *Fleischwirtschaft*, 74(3), 320-330.
- Amvrosiadis, I. (2007). Method for producing fermentation-curing products from finely-cut meat (dry sausages) by direct incorporation of olive oil and/or other plant oils and partial or full replacement of animal fat. Patent GR 2005 010 0400 A.
- Anandh, A.M., Lakshmanan, V., & Anjaneyulu, A.S.R. (2003). Designer meat foods. *Indian Food Industry*, 22(4), 40-45.
- Andrés, S.C., García, M.E., Zaritzky, N.E., & Califano, A. (2006). Storage stability of low-fat chicken sausages. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 311-319.

- Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). The use of linseed oil improves nutritional quality of the lipid fraction of dry-fermented sausages. *Food Chemistry*, 87, 69-74.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International*. (17th edition ed.). Maryland (USA): Association of Official Analytical Chemistry.
- Arihara, K. (2004). Functional Foods. In W. Jensen, C. Devine & M. Dikemann (Eds.), *Encyclopaedia of Meat Sciences* (Vol. 1, pp. 492-499). London, UK: Elsevier Science Ltd.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat science*, 74(1), 219-229.
- Ashaye, A., Gaziano, J., & Djousse, L. (2011). Red meat consumption and risk of heart failure in male physicians. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(12), 941-946.
- Ashwell, M. (2002). *Concepts of functional foods*. ILSI Europe Concise Monograph Series. Brussels, Belgium: International Life Sciences Institute
- Asp, N.-G., & Bryngelsson, S. (2008). Health claims in Europe: New legislation and PASSCLAIM for substantiation. *Journal of Nutrition*, 138(6), 1210S-1215S.
- Aspelund, T., Gudnason, V., Magnusdottir, B.T., Andersen, K., Sigurdsson, G., Thorsson, B., Steingrimsdottir, L., Critchley, J., Bennett, K., O'Flaherty, M., & Capewell, S. (2010). Analysing the Large Decline in Coronary Heart Disease Mortality in the Icelandic Population Aged 25-74 between the Years 1981 and 2006. *Plos One*, 5(11).
- Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F.B., Jakobsen, M.U., Kok, F.J., Krauss, R.M., Lecerf, J.M., LeGrand, P., Nestel, P., Riserus, U., Sanders, T., Sinclair, A., Stender, S., Tholstrup, T., & Willett, W.C. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 684-688.
- Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., Peck, C. C., Schooley, R. T., Spilker, B. A., Woodcock, J., & Zeger, S. L. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89-95.

- Aune, D., Ursin, G., & Veierod, M.B. (2009). Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia*, 52(11), 2277-2287.
- Ayo, J., Carballo, J., Serrano, J., Olmedilla-Alonso, B., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Effect of total replacement of pork backfat with walnut on the nutritional profile of frankfurters. *Meat science*, 77(2), 173-181.
- Ayo, J., Carballo, J., Solas, M.T., & Jiménez-Colmenero, F. (2008). Physicochemical and sensory properties of healthier frankfurters as affected by walnut and fat content. *Food Chemistry*, 107(4), 1547-1552.
- Babji, A.S., Alina, A.R., Chempaka, M.Y.S., Sharmini, T., Basker, R., & Yap, S.L. (1998). Replacement of animal fat with fractionated and partially hydrogenated palm oil in beef burgers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 49(5), 327-332.
- Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R., Simes, J., & Collaborators, C. T. T. (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, 366(9493), 1267-1278.
- Bailey, M.E., Shi-Lee, S.Y., Dupuy, H.P., St. Angelo, A J., & Vercellotti, J.R. (1987). Inhibition of warmed-over flavor by Maillard reaction. In A. J.S. Angelo & M.E. Bailey (Eds.), *Warmed-over-flavor of meat*. Orlando Academic Press.
- Balk, E.M., Lichtenstein, A.H., Chung, M., Kupelnick, B., Chew, P., & Lau, J. (2006). Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: A systematic review. *Atherosclerosis*, 189(1), 19-30.
- Baró, L., Fonolla, J., Peña, J. L., Martínez-Férez, A., Lucena, A., Jiménez, J., Boza, J. J., & López-Huertas, E. (2003). n-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clinical Nutrition*, 22(2), 175-182.
- Bastida, S., Sánchez-Muniz, F.J., Olivero, R., Pérez-Olleros, L., Ruiz-Roso, B., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chemistry*, 116(3), 748-754.

- Becker, C.C., Lund, P., Holmer, G., Jensen, H., & Sandstrom, B. (1999). Effects of butter oil blends with increased concentrations of stearic, oleic and linolenic acid on blood lipids in young adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(7), 535-541.
- Beldarraín, T., De la Mella, R.M., Yáñez, J., García, A., & Cepero, Y. (2003). Durabilidad de pastas untables con sabor jamón, hígado y chorizo. *Alimentaria*, 347, 87-90.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., & Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(12), 789-810.
- Bhattacharya, M., Hanna, M.A., & Mandigo, R. W. (1988). Lipid Oxidation in ground-beef patties as affected by time-temperature and product packaging parameters. *Journal of Food Science*, 53(3), 714-717.
- Bhupathiraju, S.N., & Tucker, K.L. (2011). Coronary heart disease prevention: Nutrients, foods, and dietary patterns. *Clinica Chimica Acta*, 412(17-18), 1493-1514.
- Biesalski, H.K. (2005). Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat science*, 70(3), 509-524.
- Bishop, D.J., Olson, D.G., & Knipe, C.L. (1993). Pre-emulsified corn oil, pork fat, or added moisture affect quality of reduced fat bologna quality. *Journal of Food Science*, 58, 484-487.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bloukas, J.G., & Paneras, E.D. (1993). Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. *Journal of Food Science*, 58, 705-709.
- Bloukas, J.G., Paneras, E.D., & Fournitzis, G.C. (1997a). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat science*, 45(2), 133-144.
- Bloukas, J.G., Paneras, E.D., & Fournitzis, G.C. (1997b). Sodium lactate and protective culture effects on quality characteristics and shelf-life of low-fat frankfurters produced with olive oil. *Meat science*, 45(2), 223-238.

- Boizel, R., Benhamou, P.Y., Lardy, B., Laporte, F., Foulon, T., & Halimi, S. (2000). Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care*, 23(11), 1679-1685.
- Bonanome, A., & Grundy, S.M. (1988). Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England Journal of Medicine*, 318(19), 1244-1248.
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(7), 62-65.
- Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N., & Gardini, F. (2009). Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1397-1407.
- Boyle, P., Boffetta, P., & Autier, P. (2008). Diet, nutrition and cancer: public, media and scientific confusion. *Annals of Oncology*, 19(10), 1665-1667.
- Brewer, M.S., & Wu, S.Y. (1993). Display, packaging, and meat block location effects on color and lipid oxidation of frozen lean ground-beef. *Journal of Food Science*, 58(6), 1219-1223.
- Brouwer, I.A., Katan, M.B., & Zock, P.L. (2004). Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: A meta-analysis. *Journal of Nutrition*, 134(4), 919-922.
- Cáceres, E., García, M.L., & Selgas, M.D. (2006). Design of a new cooked meat sausage enriched with calcium. *Meat science*, 73(2), 368-377.
- Cáceres, E., García, M.L., & Selgas, M.D. (2008). Effect of pre-emulsified fish oil - as source of PUFA n-3 - on microstructure and sensory properties of mortadela, a Spanish bologna-type sausage. *Meat science*, 80(2), 183-193.
- Cáceres, E., García, M.L., Toro, J., & Selgas, M.D. (2004). The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages. *Meat science*, 68(1), 87-96.
- Calhoun, C.M., Eilert, S.J., & Mandigo, R.W. (1996). Connective tissue/acidic phosphate preblend effects on reduced fat frankfurters. *Journal of Food Science*, 61(2), 459-464.
- Campo, L., & Tovar, C. (2008). Influence of the starch content in the viscoelastic properties of surimi gels. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 140-147.

- Canales, A., Bastida, S., Librelotto, J., Nus, M., Sánchez-Muniz, F. J., & Benedí, J. (2009). Platelet aggregation, eicosanoid production and thrombogenic ratio in individuals at high cardiovascular risk consuming meat enriched in walnut paste. A crossover, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*, 102(1), 134-141.
- Canales, A., Benedí, J., Nus, M., Librelotto, J., Sánchez-Montero, J. M., & Sánchez-Muniz, F. J. (2007). Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *Journal of the American College of Nutrition*, 26(3), 225-232.
- Canales, A., & Sanchez-Muniz, F. J. (2003). Paraoxonase, something more than an enzyme? *Medicina Clinica*, 121(14), 537-548.
- Canales, A., Sánchez-Muniz, F.J., Bastida, S., Librelotto, J., Nus, M., Corella, D., Guillen, M., & Benedí, J. (2011). Effect of walnut-enriched meat on the relationship between VCAM, ICAM, and LTB4 levels and PON-1 activity in ApoA4 360 and PON-1 allele carriers at increased cardiovascular risk. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65(6), 703-710.
- Candogan, K., & Kolsarici, N. (2003). The effects of carrageenan and pectin on some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. *Meat science*, 64(2), 199-206.
- Carbajal, A. (2005). Evolución del Consumo de carne y derivados. Factores que condicionan su ingesta y papel nutricional en la dieta española. In F. Sánchez-Muniz, F. Jiménez-Colmenero & B. Olmedilla-Alonso (Eds.), *Derivados Cárnicos Funcionales: Estrategias y Perspectivas*. Madrid: Fundación Española de la Nutrición.
- Carballo, J., Cavestany, M., & Jiménez-Colmenero, F. (1991). Effect of light on color and reaction of nitrite in sliced pork bologna under different chilled storage temperatures. *Meat science*, 30(3), 235-244.
- Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M.T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996a). Characteristics of high- and low-fat bologna sausages as affected by final internal cooking temperature and chilling storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(1), 40-48.
- Carballo, J., Fernández, P., Barreto, G., Solas, M.T., & Jiménez-Colmenero, F. (1996b). Morphology and texture of bologna sausage containing different levels of fat, starch and egg white. *Journal of Food Science*, 61, 652-655.

- Carballo, J., Fernández, P., & Jiménez Colmenero, F. (1996). Texture of uncooked and cooked low- and high-fat meat batters as affected by high hydrostatic pressure *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 1624-1625.
- Carballo, J., Mota, N., Barreto, G., & Colmenero, F.J. (1995). Binding-properties and color of bologna sausage made with varying fat levels, protein-levels and cooking temperatures. *Meat science*, 41(3), 301-313.
- Cassens, R.G. (1997). Residual nitrite in cured meat. *Food Technology*, 51(2), 53-55.
- Cassens, R.G., Greaser, M.L., Ito, T., & Lee, M. (1979). Reactions of nitrite in meat. *Food Technology*, 33(7), 46-57.
- Castelli, W.P. (1988). Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol*, 4 Suppl A, 5A-10A.
- Cavestany, M., Jiménez-Colmenero, F., Solas, M.T., & Carballo, J. (1994). Incorporation of sardine surimi in bologna sausage containing different fat levels. *Meat science*, 38(1), 27-37.
- Chan, D.S.M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D.C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. *Plos One*, 6(6).
- Chatzigeorgiou, A. (2008). Method for the production of heat-treated comminuted meat products with intramuscular injection of olive oil and other vegetable oil as replacement of animal fat. Patent GR1005942-B2.
- Chen, J., & Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsions: The effect of protein-surfactant interactions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 91-97.
- Chin, K.B., Keeton, J.T., Longnecker, M.T., & Lamkey, J.W. (1999). Utilization of soy protein isolate and konjac blends in a low-fat bologna (model system). *Meat science*, 53(1), 45-57.
- Chin, K. B., Keeton, J.T., Miller, R.K., Longnecker, M.T., & Lamkey, J.W. (2000). Evaluation of konjac blends and soy protein isolate as fat replacements in low-fat bologna. *Journal of Food Science*, 65(5), 756-763.
- Choi, Y.S., Choi, J.H., Han, D.J., Kim, H.Y., Lee, M.A., Kim, H.W., Jeong, J.Y., & Kim, C.J. (2009). Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. *Meat science*, 82(2), 266-271.

- Clark, A.H., & Ross-Murphy, S.B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advance Polymer Science*, 83, 57-192.
- Claus, J.R., Hunt, M.C., & Kastner, C.L. (1989). Effects of substituting added water for fat on the textural, sensory, and processing characteristics of bologna. *Journal of Muscle Foods*, 1(1), 1-21.
- Cofrades, S., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (1997). Heating rate effects on high-fat and low-fat frankfurters with a high content of added water. *Meat science*, 47(1-2), 105-114.
- Cofrades, S., Hughes, E., & Troy, D.J. (2000). Effects of oat fibre and carrageenan on the texture of frankfurters formulated with low and high fat. *European Food Research and Technology*, 211(1), 19-26.
- Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Triki, M., & Jiménez-Colmenero, F. (2011). Quality characteristics of low-salt restructured poultry with microbial transglutaminase and seaweed. *Meat science*, 87(4), 373-380.
- Corrección de errores del Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de Diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:ES:PDF>.
- Covas, M.I., Konstantinidou, V., & Fito, M. (2009). Olive Oil and Cardiovascular Health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 477-482.
- Crehan, C.M., Hughes, E., Troy, D.J., & Buckley, D.J. (2000). Effects of fat level and maltodextrin on the functional properties of frankfurters formulated with 5, 12 and 30% fat. *Meat science*, 55(4), 463-469.
- Cross, A.J., & Sinha, R. (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(1), 44-55.
- Cross, H.R., Leu, R., & Miller, M.F. (1987). Scope of warmed-over-flavor and its importance to the meat industry. In A. J. S. Angelo & M. E. Bailey (Eds.), *Warmed-over-flavor of meat* (pp. 1-18). Orlando: Academic Press.
- Cuesta, C., Ródenas, S., Merinero, M.C., Rodríguez-Gil, S., & Sánchez-Muniz, F. (1998). Lipoprotein profiles and serum peroxide levels of aged women consuming palmolein or oleic acid-rich sunflower oil diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(9), 675-683.

- Damasceno, N.R., Pérez-Heras, A., Serra, M., Cofan, M., Sala-Vila, A., Salas-Salvado, J., & Ros, E. (2011). Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 21 Suppl 1, S14-20.
- D'Arrigo, M., Hoz, L., Cambero, I., López-Bote, C. J., Pin, C., & Ordóñez, J. A. (2004). Production of n-3 fatty acid enriched, pork liver pate. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 37(6), 585-591.
- De las Rivas, B., Ruiz-Capillas, C., Carrascosa, A.V., Curiel, J.A., Jiménez-Colmenero, F., & Muñoz, R. (2008). Biogenic amine production by Gram-positive bacteria isolated from Spanish dry-cured "chorizo" sausage treated with high pressure and kept in chilled storage. *Meat science*, 80(2), 272-277.
- Decker, E.A., & Park, Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat science*, 86(1), 49-55.
- Decker, E.A., & Xu, Z.M. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technology*, 52(10), 54-59.
- Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. Disponible en:
<http://www.boe.es/boe/dias/1967/10/17/pdfs/A14180-14187.pdf>
- Demeyer, D., Honikel, K., & De Smet, S. (2008). The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry. *Meat science*, 80(4), 953-959.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat science*, 74(1), 188-196.
- Dickinson, E., & Golding, M. (1997). Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191, 166-176.
- Dickinson, E., & Stainsby, G. (1988). Emulsion stability. In E. Dickinson & G. Stainsby (Eds.), *Advances in food emulsions and foams* (pp. 1-44). London (UK) and New York (USA): Elsevier Applied Science.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., & Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1-S27.

- Djordjevic, D., McClements, D.J., & Decker, E.A. (2004). Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: Potential ω -3 fatty acid delivery systems (Part B). *Journal of Food Science*, 69, C356-362.
- Dobiasova, M., Frohlich, J., Sedova, M., Cheung, M. C., & Brown, B. G. (2011). Cholesterol esterification and atherogenic index of plasma correlate with lipoprotein size and findings on coronary angiography. *Journal of Lipid Research*, 52(3), 566-571.
- Domazakies, E.S. (2005). Method for production of meat products from entire muscular tissue and direct integration of olive oil. Patent GR1004991-B1.
- Dzudie, T., Kouebou, C.P., Essia-Ngang, J.J., & Mbofung, C.M.F. (2004). Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties. *Journal of Food Engineering*, 65(1), 67-72.
- Echarte, M., Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish pates. *Food Chemistry*, 86(1), 47-53.
- Edwards, R.A., Dainty, R.H., Hibbard, C.M., & Ramantanis, S.V. (1987). Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 63(5), 427-434.
- EFSA. (2003). The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *The EFSA Journal* 14, 1-31.
- EFSA. (2005). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat. *The EFSA Journal*, 253, 1-29.
- EFSA. (2006). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies. Tolerable upper intake for vitamins and minerals.
- EFSA. (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol. *The EFSA Journal*, 8(3), 1461.
- EFSA. (2011a). Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA Journal*, 9(4), 1984.

- EFSA.(2011b). Panel on Dietetic Products Nutrition, and Allergies (NDA). Public consultation on the draft scientific opinion on dietary reference values for protein. Disponible en:
<http://www.efsa.europa.eu/en/consultationsclosed/call/110712.pdf>
- Enser, M. (2000). Producing meat for healthy eating. In *Proceeding of the 46th International Congress of Meat Science and Technology*, Vol I, Buenos Aires. pp 124-129.
- Estévez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pate. *Meat science*, 68(4), 551-558.
- Estévez, M., Morcuende, D., & Cava, R. (2006). Extensively reared Iberian pigs versus intensively reared white pigs for the manufacture of frankfurters. *Meat science*, 72(2), 356-364.
- Estévez, M., Morcuende, D., Ramírez, R., Ventanas, J., & Cava, R. (2004). Extensively reared Iberian pigs versus intensively reared white pigs for the manufacture of liver pate. *Meat science*, 67(3), 453-461.
- Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S., & Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pate. *Lwt-Food Science and Technology*, 40(1), 58-65.
- Estévez, M., Ventanas, J., Cava, R., & Puolanne, E. (2005). Characterisation of a traditional Finnish liver sausage and different types of Spanish liver pates: A comparative study. *Meat science*, 71(4), 657-669.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pate as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92(3), 449-457.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2006). Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pate. *Meat science*, 74(2), 396-403.
- Fang, L., Ruitong, D., Jinyuan, Z., & Xingmin, L. (2010). Optimizing color and lipid stability of beef patties with a mixture design incorporating with tea catechins, carnosine, and alpha-tocopherol. *Journal of Food Engineering*, 98(2), 170-177.
- FAO. (2011). Food Outlook. Global Market Analysis. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- FAO/WHO (2010). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. FAO FOOD AND NUTRITION PAPER 91. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i1953e/i1953e00.pdf>
- Faraji, H., McClements, D.J., & Decker, E.A. (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4558-4564.
- Feiner, G. (2006). *Meat Products Handbook. Practical science and technology*. Cambridge (England): Woodhead Publishing.
- Ferguson, L.R. (2010). Meat and cancer. *Meat science*, 84(2), 308-313.
- Fernández-Ginés, J.M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2005). Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*, 70(2), R37-R43.
- Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2004). Lemon albedo as a new source of dietary fiber: Application to bologna sausages. *Meat science*, 67(1), 7-13.
- Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J.M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barbera, E., & Pérez-Álvarez, J. A. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 176-185.
- Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., & Pérez-Álvarez, J.A. (2004). Quality characteristics of ostrich liver pate. *Journal of Food Science*, 69(2), S85-S91.
- Fernández-Martín, F., Guerra, M.A., López, E., Solas, M.T., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2000). Characteristics of pressurised pork meat batters as affected by addition of plasma proteins, apple fibre and potato starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1230-1236.
- Fernández-Martín, F., López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association. *Meat science*, 83(2), 209-217.

- Fisinin, V. I., Papazyan, T. T., & Surai, P. E. (2009). Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 18-28.
- Fung, T.T., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Manson, J.E., & Hu, F.B. (2001). Dietary patterns and the risk of coronary heart disease in women. *Archives of Internal Medicine*, 161(15), 1857-1862.
- Galán, I., García, M. L., & Selgas, M.D. (2010). Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat science*, 84(3), 437-443.
- Galán, I., Garcia, M.L., & Selgas, M.D. (2011a). Effects of ionising irradiation on quality and sensory attributes of ready-to-eat dry fermented sausages enriched with folic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(3), 469-477.
- Galán, I., Garcia, M.L., & Selgas, M.D. (2011b). Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat science*, 87(4), 330-335.
- Gallagher, A. M., Meijer, G. W., Richardson, D. P., Rondeau, V., Skarp, M., Stasse-Wolthuis, M., Tweedie, G. C., & Witkamp, R. (2011). A Standardised Approach Towards PROving the Efficacy of Foods and Food Constituents for Health CLAIMs (PROCLAIM): Providing Guidance. *British Journal of Nutrition*, 106, S16-S28.
- Ganhao, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010). Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat science*, 85(3), 402-409.
- García, M.L., Cáceres, E., & Selgas, M.D. (2006). Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(10), 1207-1215.
- García, M.L., Cáceres, E., & Selgas, M.D. (2007). Utilisation of fruit fibres in conventional and reduced-fat cooked-meat sausages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4), 624-631.
- García, M.L., Calvo, M.M., & Selgas, M.D. (2009). Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat science*, 83(1), 45-49.

- García-Iníguez de Ciriano, M., Larequi, E., Rehecho, S., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., Navarro-Blasco, Í., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2010). Selenium, iodine, omega-3 PUFA and natural antioxidant from *Melissa officinalis* L.: a combination of components from healthier dry fermented sausages formulation. *Meat science*, 85(2), 274-279.
- Gardner, C.D., & Kraemer, H.C. (1995). Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids: a metaanalysis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 15(11), 1917-1927.
- Garg, M.L., Wood, L.G., Singh, H., & Moughan, P.J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71, R66-R71.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., & Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Gibson, G.R., & Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gil, A. (2010). *Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. Buenos Aires: Panamericana.
- Gillingham, L.G., Harris-Janz, S., & Jones, P.J.H. (2011). Dietary Monounsaturated Fatty Acids Are Protective Against Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease Risk Factors. *Lipids*, 46(3), 209-228.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., & Brown, M.S. (1979). Binding-site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low-density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 333-337.
- Gotto, A.M., Pownall, H.J., & Havel, R.J. (1986). Introduction to the plasma-lipoproteins. *Methods in Enzymology*, 128, 3-41.
- Granado-Lorencio, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Perez-Sacristan, B., Delgado-Pando, G., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Lutein-enriched frankfurter-type products: Physicochemical characteristics and lutein in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry*, 120(3), 741-748.

- Gregg, L.L., Claus, J.R., Hackney, C.R., & Marriott, N.G. (1993). Low-fat, high added water bologna from massaged, minced batter. *Journal of Food Science*, 58(2), 258-264.
- Grigemo-Miguel, N., Abadías-Seros, M.I., & Martín-Belloso, O. (1999). Characterisation of low-fat high-dietary fibre frankfurters. *Meat science*, 52(3), 247-256.
- Guallar-Castillón, P., Rodríguez-Artalejo, F., Tormo, M.J., Sánchez, M.J., Rodríguez, L., Quirós, J.R., Navarro, C., Molina, E., Martínez, C., Marín, P., Lopez-Garcia, E., Larrañaga, N., Huerta, J.M., Dorronsoro, M., Chirlaque, M.D., Buckland, G., Barricarte, A., Banegas, J.R., Arriola, L., Ardanaz, E., González, C.A., & Moreno-Iribas, C. (2010). Major dietary patterns and risk of coronary heart disease in middle-aged persons from a Mediterranean country: The EPIC-Spain cohort study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, xx, 1-8.
- Haak, L., Raes, K., & De Smet, S. (2009). Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(8), 1360-1365.
- Halász, A., Barath, A., Simonsarkadi, L., & Holzapfel, W. (1994). Biogenic-amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science & Technology*, 5(2), 42-49.
- Halton, T.L., & Hu, F.B. (2004). The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: A critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(5), 373-385.
- Harris, W. S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *The American journal of clinical nutrition*, 65(5 Suppl), 1645S-1654S
- Harris, W.S., Miller, M., Tighe, A.P., Davidson, M.H., & Schaefer, E.J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, 197(1), 12-24.
- Harriss, L.R., English, D.R., Powles, J., Giles, G.G., Tonkin, A.M., Hodge, A.M., Brazionis, L., & O'Dea, K. (2007). Dietary patterns and cardiovascular mortality in the Melbourne Collaborative Cohort Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(1), 221-229.

- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., & Kerry, J.P. (2010). Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. *Meat science*, 84(4), 613-620.
- He, K. (2009). Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease-Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? *Progress in Cardiovascular Diseases*, 52(2), 95-114
- Hegsted, D.M., McGandy, R.B., Myers, M.L., & Stare, F.J. (1965). Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *American Journal of Clinical Nutrition*, 17(5), 281-&.
- Heidemann, C., Scheidt-Nave, C., Richter, A., & Mensink, G.B.M. (2011). Dietary patterns are associated with cardiometabolic risk factors in a representative study population of German adults. *British Journal of Nutrition*, 106(8), 1253-1262.
- Heidemann, C., Schulze, M.B., Franco, O.H., van Dam, R.M., Mantzoros, C.S., & Hu, F.B. (2008). Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. *Circulation*, 118(3), 230-237.
- Hénon, G., Kemeny, Z., Recseg, K., Zwobada, F., & Kovari, K. (1999). Deodorization of vegetable oils. Part I: Modeling the geometrical isomerization of polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 73-81.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M.T., & Vidal-Carou, M. C. (1996). Ion-pair high-performance liquid cinematographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2710-2715.
- Hettiarachcy, N.S., & Kalaphaty, U. (1998). Functional properties of soy proteins In S. F.J.R. Whitaker, A.L. Munguia, R.Y. Yada & G. Fuller (Ed.), *Functional properties of proteins and lipids* (pp. 80-95). Washington, DC (USA): American Chemical Society.
- Holley, R.A. (1997). Asymmetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham and bologna. *Journal of Food Protection*, 60(5), 510-519.

- Hong Chul, L., & Koo Bok, C. (2009). Physicochemical, textural, and sensory properties of low-fat/reduced-salt sausages as affected by salt levels and different type and level of milk proteins. *Food Science and Biotechnology*, 18(1), 36-42.
- Hong, G., Lee, S., & Min, S. (2004a). Effects of replacement pork backfat with soybean oil on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology*, 13(1), 51-56.
- Hong, G., Lee, S., & Min, S. (2004b). Effects of substituted level of added water for fat on the quality characteristics of spreadable liver sausage. *Food Science and Biotechnology*, 13(4), 397-402.
- Hoogenkamp, H.W. (1989a). Low-fat and low-cholesterol sausages. *Fleischerie*, 40, III-IV.
- Hoogenkamp, H.W. (1989b). Low-calories sausages, spread and mousses. *Fleischerie*, 40 IV-V and 40, III-IV.
- Hu, F.B., Manson, J.E., & Willett, W.C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(1), 5-19.
- Hu, F.B., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Spiegelman, D., & Willett, W.C. (2000). Prospective study of major dietary patterns and risk of coronary heart disease in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(4), 912-921.
- Huang, C.L., & Sumpio, B.E. (2008). Olive oil, the Mediterranean diet, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, 207(3), 407-416.
- Hughes, E., Mullen, A.M., & Troy, D.J. (1998). Effects of fat level, tapioca starch and whey protein on frankfurters formulated with 5% and 12% fat. *Meat science*, 48(1-2), 169-180.
- Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., & Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. *International Journal of Cancer*, 125(1), 171-180.

- IOM. (2005). Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (2002/2005). Washington DC: National Academy Press. Disponible en: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10490
- IOM. (2010). Promoting cardiovascular health in the developing world. A critical challenge to achieve global health. In V. Fuster & B. B. Kelly (Eds.). Washington, D.C.: The National Academies Press.
- Jakobsen, M.U., O'Reilly, E.J., Heitmann, B.L., Pereira, M.A., Balter, K., Fraser, G.E., Goldbourt, U., Hallmans, G., Knekt, P., Liu, S., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W.C., & Ascherio, A. (2009). Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5), 1425-1432.
- Jamora, J.J., & Rhee, K.S. (2002). Storage stability of extruded products from blends of meat and nonmeat ingredients: Evaluation methods and antioxidative effects of onion, carrot, and oat ingredients. *Journal of Food Science*, 67(5), 1654-1659.
- Javidipour, I., & Vural, H. (2002). Effects of incorporation of interesterified plant oils on quality and fatty acid composition of Turkish-type salami. *Nahrung-Food*, 46(6), 404-407.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 56-66.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 567-578.
- Jimenez-Colmenero, F., Ayo, M.J., & Carballo, J. (2005). Physicochemical properties of low sodium frankfurter with added walnut: effect of transglutaminase combined with caseinate, KCl and dietary fibre as salt replacers. *Meat science*, 69(4), 781-788.
- Jiménez-Colmenero, F., Barreto, G., Mota, N., & Carballo, J. (1995). Influence of protein and fat content and cooking temperature on texture and sensory evaluation of bologna sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 28, 481-487.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat science*, 59, 5-13.

- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Fernández, P., Cofrades, S., & Cortés, E. (1997). Retail chilled display storage of high- and reduced-fat sliced bologna. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1099-1104.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Solas, M.T. (1995). The effect of use of freeze-thawed pork on the properties of Bologna sausages with two fat levels. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 345-355.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., Herrero, A.M., Fernández-Martín, F., Rodríguez-Salas, L., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats. *Food Hydrocolloids*, 26, 63-72.
- Jiménez-Colmenero, F., Cofrades, S., López-López, I., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T., & Solas, M. T. (2010). Technological and sensory characteristics of reduced/low-fat, low-salt frankfurters as affected by the addition of konjac and seaweed. *Meat science*, 84(3), 356-363.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Cofrades, S., & Ruiz-Capillas, C. (2011). Meat and functional foods. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of Meat and Meat Processing* (pp. 225-248): John Wiley & Son, Inc.
- Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A., Pintado, T., Solas, M.T., & Ruiz-Capillas, C. (2010). Influence of emulsified olive oil stabilizing system used for pork backfat replacement in frankfurters. *Food Research International*, 43(8), 2068-2076.
- Jiménez-Colmenero, F., Reig, M., & Toldrá, F. (2006). New approaches for the development of functional meat products. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp. 275-308). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis.
- Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J., Olmedilla-Alonso, B., & Collaborators. (2010). Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chemistry*, 123(4), 959-967.
- Josquin, N.M., Linssen, J.P.H., & Houben, J.H. (2012). Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back-fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil. *Meat science*, 90(1), 81-86.
- Kaack, K., & Pedersen, L. (2005). Low-energy and high-fibre liver pate processed using potato pulp. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 278-282.

- Kannel, W.B., Gordon, T., & Schwartz, M.J. (1971). Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease-Framingham study. *American Journal of Cardiology*, 27(4), 335-&.
- Kao, W.T., & Lin, K.W. (2006). Quality of reduced-fat frankfurter modified by konjac-starch mixed gels. *Journal of Food Science*, 71(4), S326-S332.
- Katan, M.B., Brouwer, I.A., Clarke, R., Geleijnse, J.M., & Mensink, R.P. (2010). Saturated fat and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92(2), 459-460.
- Katan, M.B., Zock, P.L., & Mensink, R.P. (1995). Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annual Review of Nutrition*, 15, 473-493.
- Katsaras, K., & Peetz, P. (1989). Morphological-changes in dark cutting beef when heated. *Fleischwirtschaft*, 69(6), 1043-1045.
- Kayaardi, S., & Gok, V. (2004). Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk). *Meat science*, 66(1), 249-257.
- Kelemen, L.E., Kushi, L.H., Jacobs, D.R., & Cerhan, J.R. (2005). Associations of dietary protein with disease and mortality in a prospective study of postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, 161(3), 239-249.
- Keys, A., & Parlin, R.W. (1966). Serum cholesterol response to changes in dietary lipids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 19(3), 175-&.
- Kim, I.S., Jin, S.K., Mandal, P.K., & Kang, S.N. (2011). Quality of low-fat pork sausages with tomato powder as colour and functional additive during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 48(5), 591-597.
- Kolanowski, W., Swiderski, F., & Berger, S. (1999). Possibilities of fish oil application for food products enrichment with ω -3 PUFA. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 39-49.
- Kolanowski, W., & Laufenberg, G. (2006). Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 472-477.
- Kong, B., Zhang, H., & Xiong, Y.L. (2010). Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. *Meat science*, 85(4), 772-778.

- Kontogianni, M.D., Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Chrysoshoou, C., & Stefanadis, C. (2008). Relationship between meat intake and the development of acute coronary syndromes: the CARDIO2000 case-control study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(2), 171-177.
- Kotchen, T.A., & McCarron, D.A. (1998). Dietary electrolytes and blood pressure - A statement for healthcare professionals from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*, 98(6), 613-617.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health enhancing foods. Opportunities for strengthening the sector in developing countries The World Bank.
- Kramlich, W.E., Pearson, A.M., & Tauber, F.W. (1973). *Processed meats*. AVI Publishing Co.Inc.
- Kratz, M. (2005). Dietary cholesterol, atherosclerosis and coronary heart disease. *Handbook of experimental pharmacology*, 170, 195-213.
- Kris-Etherton, P.M. (1999). Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation*, 100, 1253-1258.
- Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A., & Etherton, T.D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81(2-3), 99-104.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., & Nutrition, C. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106(21), 2747-2757.
- Kris-Etherton, P M., & Yu, S.M. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: Human studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(5), S1628-S1644.
- Kromhout, D., Geleijnse, J.M., Menotti, A., & Jacobs, D.R., Jr. (2011). The confusion about dietary fatty acids recommendations for CHD prevention. *British Journal of Nutrition*, 106(5), 627-632.
- Kromhout, D., Menotti, A., Bloemberg, B., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Dontas, A.S., Fidanza, F., Giaipali, S., Jansen, A., Karvonen, M., Katan, M., Nissinen, A., Nedeljkovic, S., Pekkanen, J., Pekkarinen, M., Punsar, S., Rasanen, L., Simic, B., & Toshima, H. (1995). Dietary saturated and trans-fatty-acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Preventive Medicine*, 24(3), 308-315.

- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazani, K., Susa, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62, 488-490, 515.
- Kurth, L., & Rogers, P.J. (1984). Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soy protein, casein and gluten. *Journal of Food Science*, 49, 573-576, 589.
- Kuulasmaa, K., Tunstall-Pedoe, H., Dobson, A., Fortmann, S., Sans, S., Tolonen, H., Evans, A., Ferrario, M., Tuomilehto, J., & Project, W.M. (2000). Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*, 355(9205), 675-687.
- Larsson, S.C., & Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*, 119(11), 2657-2664.
- Layman, D.K., Clifton, P., Gannon, M.C., Krauss, R.M., & Nuttall, F.Q. (2008). Protein in optimal health: heart disease and type 2 diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1571S-1575S.
- Law, M. R., Morris, J. K., & Wald, N. J. (2009). Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *British Medical Journal*, 338.
- Lebret, B. (2008). Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal*, 2(10), 1548-1558.
- Lee, H.A., Choi, S.J., & Moon, T.W. (2006). Characteristics of sodium caseinate-and soy protein isolate-stabilized emulsion-gels formed by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 71, C352-357.
- Lee, S., Hernández, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., & Decker, E.A. (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71(3), C233-C238.
- León, H., Shibata, M. C., Sivakumaran, S., Dorgan, M., Chatterley, T., & Tsuyuki, R. T. (2008). Effect of fish oil on arrhythmias and mortality: systematic review. *British Medical Journal*, 337.
- Li, D., Siriamornpun, S., Wahlqvist, M.L., Mann, N.J., & Sinclair, A.J. (2005). Lean meat and heart health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14(2), 113-119.

- Lichtenstein, A.H., Appel, L.J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H.A., Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W.S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel, L., Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M., & Wylie-Rosett, J. (2006). Diet and lifestyle recommendations revision 2006 - A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee (vol 114, pg 82, 2006). *Circulation*, 114(1), 82-+.
- Lijinsky, W. (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1-2), 129-138.
- Lin, J.H., Lin, Y.H., & Kuo, C.C. (2002). Effect of dietary fish oil on fatty acid composition, lipid oxidation and sensory property of chicken frankfurters during storage. *Meat science*, 60(2), 161-167.
- Lin, K.W., & Huang, H.Y. (2003). Konjac/gellan gum mixed gels improve the quality of reduced-fat frankfurters. *Meat science*, 65(2), 749-755.
- Linseisen, J., Kesse, E., Slimani, N., Bueno-de-Mesquita, H. B., Ocke, M. C., Skeie, G., Kumle, M., Iraeta, M. D., Gomez, P. M., Janzon, L., Stattin, P., Welch, A. A., Spencer, E. A., Overvad, K., Tjonneland, A., Clavel-Chapelon, F., Miller, A. B., Klipstein-Grobusch, K., Lagiou, P., Kalapothaki, V., Masala, G., Giurdanella, M. C., Norat, T., & Riboli, E. (2002). Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: results 24-hour dietary recalls. *Public Health Nutrition*, 5(6B), 1243-1258.
- Liu, M., Lee, D., & Damodaran, S. (1999). Emulsifying properties of acidic sub-units of soy 11S globulin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 4970-4975.
- Liu, M.N., Huffman, D.L., & Egbert, W.R. (1991). Replacement of beef fat with partially hydrogenated plat oil in lean ground beef patties. *Journal of Food Science*, 56(3), 861-862.
- Loh, Y.H., Jakszyn, P., Luben, R.N., Mulligan, A.A., Mitrou, P.N., & Khaw, K.-T. (2011). N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(5), 1053-1061.
- López-López, I., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009a). Low-fat frankfurters enriched with n-3 PUFA and edible seaweed: Effects of olive oil and chilled storage on physicochemical, sensory and microbial characteristics. *Meat science*, 83(1), 148-154.

- López-López, I., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2009b). Design and nutritional properties of potential functional frankfurters based on lipid formulation, added seaweed and low salt content. *Meat science*, 83(2), 255-262.
- López-Miranda, J., Pérez-Martínez, P., & Pérez-Jiménez, F. (2006). Health benefits of monounsaturated fatty acids. In C. Williams & J. Buttriss (Eds.), *Improving the Fat Content of Foods* (pp. 71-106). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Lowder, A.C., & Osburn, W.N. (2010). Inclusion of Blended Lipid Solutions as Functional Ingredients to Alter the Fatty Acid Profile of Beef Patties. *Journal of Food Science*, 75(7), S355-S364.
- Lunn, J., & Theobald, H.E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 31(3), 178-224.
- Lurueña-Martínez, M.A., Vivar-Quintana, A.M., & Revilla, I. (2004). Effect of locust bean/xanthan gum addition and replacement of pork fat with olive oil on the quality characteristics of low-fat frankfurters. *Meat science*, 68, 383-389.
- Lynch, P.B., & Kerry, J.P. (2000). Utilizing diet to incorporate bioactive compounds and improve the nutritional quality of muscle foods. In: Decker, E.A., Faustman, C., López-Bote, C., editors. *Antioxidant in muscle foods. Nutritional Strategies to Improve Quality*. New York: John Wiley & Sons. pp. 455-480.
- Madden, R.H. (1984). Pork liver pate - microbiological considerations for small scale production. *Food Trade Review*, 54(11), 604.
- MAFF. (1998). *Fatty acids. Supplement to McCance & Widdowson's. The composition of foods*.: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Magrinya, N., Bou, R., Tres, A., Rius, N., Codony, R., & Guardiola, F. (2009). Effect of Tocopherol Extract, *Staphylococcus carnosus* Culture, and Celery Concentrate Addition on Quality Parameters of Organic and Conventional Dry-Cured Sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8963-8972.
- Mannisto, S., Kontto, J., Kataja-Tuomola, M., Albanes, D., & Virtamo, J. (2010). High processed meat consumption is a risk factor of type 2 diabetes in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention study. *British Journal of Nutrition*, 103(12), 1817-1822.
- MARM. (2010). La alimentación mes a mes. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.

- Márquez, E.J., Ahmed, E.M., West, R.L., & Johnson, D.D. (1989). Emulsion stability and sensory quality of beef frankfurters produced at different fat and peanut oil levels. *Journal of Food Science*, 54, 867-870, 873.
- Martín, D., Antequera, T., Muriel, E., Pérez-Palacios, T., & Ruiz, J. (2009). Liver pate from pigs fed conjugated linoleic acid and monounsaturated fatty acids. *European Food Research and Technology*, 228(5), 749-758.
- Martín, D., Ruiz, J., Kivikari, R., & Puolanne, E. (2008). Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver pates: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. *Meat science*, 80(2), 496-504.
- Mata, P., Alonso, R., LopezFarre, A., Ordovas, J. M., Lahoz, C., Garces, C., Caramelo, C., Codoceo, R., Blazquez, E., & deOya, M. (1996). Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 16(11), 1347-1355.
- Mattson, F.H., & Grundy, S.M. (1985). Comparison of effects of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *Journal of Lipid Research*, 26, 194-202.
- McAfee, A.J., McSorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M.W., Bonham, M.P., & Fearon, A.M. (2010). Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat science*, 84(1), 1-13.
- McIntosh, G.H., Royle, P.J., Le Leu, R.K., Regester, G.O., Johnson, M.A., Grinsted, R.L., Kenward, R.S., & Smithers, G.W. (1998). Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal*, 8(5-6), 425-434.
- McNamara, D.J. (2000). Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), 310-320.
- Mensink, R. P., Aro, A., Den Hond, E., German, J. B., Griffin, B. A., ter Meer, H. U., Mutanen, M., Pannemans, D., & Stahl, W. (2003). PASSCLAIM - Diet-related cardiovascular disease. *European Journal of Nutrition*, 42, 6-27.
- Mensink, R.P., & Katan, M.B. (1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A metaanalysis of 27 trials. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12(8), 911-919.

- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D.M., & Katan, M.B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1146-1155.
- Mente, A., de Koning, L., Shannon, H.S., & Anand, S.S. (2009). A Systematic Review of the Evidence Supporting a Causal Link Between Dietary Factors and Coronary Heart Disease. *Archives of Internal Medicine*, 169(7), 659-669.
- Mercadante, A.Z., Capitani, C.D., Decker, E.A., & Castro, I.A. (2010). Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. *Meat science*, 84(4), 718-726.
- Micha, R., Wallace, S.K., & Mozaffarian, D. (2010). Red and Processed Meat Consumption and Risk of Incident Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes Mellitus A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*, 121(21), 2271-U2252.
- Micheel, C. M., & Ball, J. R. (2010). Evaluation of biomarkers and surrogate endpoints in chronic disease. In: Washington DC, USA: Institute of Medicine of the National Academies. The National Academies Press.
- Moon, S.S., Kim, Y.T., Jin, S.-K., & Kim, I.-S. (2008). Effects of Sodium Chloride, Potassium Chloride, Potassium Lactate and Calcium Ascorbate on the Physico-chemical Properties and Sensory Characteristics of Sodium-reduced Pork Patties. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 28(5), 567-573.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2005). *Tablas de composición de alimentos*. Madrid: Pirámide.
- Morgan, S.A., Sinclair, A.J., & Odea, K. (1993). Effect on serum lipids of addition of safflower oil or olive oil to very-low-fat diets rich in lean beef. *Journal of the American Dietetic Association*, 93(6), 644-648.
- Morris, D. H., & Vaisey-Genser, M. (2003). Availability and labeling of flaxseed food products and supplements. In L. U. Thompson & S. C. Cunnae (Eds.), *Flaxseed in human nutrition*, 2nd edition. Champaign, USA: AOCS Press.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 204-210.

- MSPS/AESAN. (2010). Estrategia NAOS, plan de reducción del consumo de sal. Ministerio de Sanidad y Política Social. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en:
http://www.naos.aesan.msps.es/naos/ficheros/estrategia/Folleto_Sal4.pdf
- MSSSI/AESAN. (2012a). Evaluación nutricional de la dieta española I. Energía y macronutrientes. Sobre datos de Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en:
http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/valoracion_nutricional_enide_macronutrientes.pdf
- MSSSI/AESAN. (2012b). Evaluación nutricional de la dieta española II. Micronutrientes. Sobre datos de Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en:
http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/estudios_evaluacion_nutricional/Valoracion_nutricional_ENIDE_micronutrientes.pdf
- Muguerza, E., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). Functional dry fermented sausages manufactured with high levels of *n* – 3 fatty acids: nutritional benefits and evaluation of oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1061-1068.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 452-457.
- Muguruma, M., Tsuruoka, K., Katayama, K., Erwanto, Y., Kawahara, S., Yamauchi, K., Sathe, S. K., & Soeda, T. (2003). Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate. *Meat science*, 63, 191-197.
- Murphy, A., Kerry, J.P., Buckley, J., & Gray, I. (1998). The antioxidative properties of rosemary oleoresin and inhibition of off-flavours in precooked roast beef slices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2), 235-243.
- Natarajan, S., Glick, H., Criqui, M., Horowitz, D., Lipsitz, S.R., & Kinoshian, B. (2003). Cholesterol measures to identify and treat individuals at risk for coronary heart disease. *Am J Prev Med*, 25(1), 50-57.

- NHLBI. (May 2001). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Executive Summary. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI).
- Nicklas, T.A., O'Neil, C.E., Zhanovec, M., Keast, D.R., & Fulgoni, V.L., III. (2012). Contribution of beef consumption to nutrient intake, diet quality, and food patterns in the diets of the US population. *Meat science*, 90(1), 152-158.
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., & Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: Dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*, 98(2), 241-256.
- Nykter, M., Kymalainen, H.-R., Gates, F., & Sjoberg, A.-M. (2006). Quality characteristics of edible linseed oil. *Agricultural and Food Science*, 15(4), 402-413.
- Odea, K., Traianedes, K., Chisholm, K., Leyden, H., & Sinclair, A.J. (1990). Cholesterol lowering effect of a low-fat diet containing lean beef is reversed by the addition of beef fat. *American Journal of Clinical Nutrition*, 52(3), 491-494.
- Olmedilla-Alonso, B., & Granado-Lorencio, F. (2004). Evaluación del efecto funcional: biomarcadores. In F. Jiménez-Colmenero, F. J. Sánchez-Muniz & B. Olmedilla-Alonso (Eds.), *La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales*. Madrid, Spain: Fundación Española de la Nutrición y Editec@Red SL.
- Olmedilla-Alonso, B., Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., & Blanco-Navarro, I. (2006). Nutritional approach for designing meat-based functional food products with nuts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(7), 537-542.
- Olmedilla-Alonso, B.; Granado-Lorencio, F.; Herrero-Barbudo, C.; Blanco-Navarro, I.; Blázquez-García, S; Pérez-Sacristán, B. (2008). Consumption of restructured meat products with added walnuts has a cholesterol-lowering effect in subjects at high cardiovascular risk: a randomised, crossover, placebo-controlled study. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2): 342-348.
- Oomah, B. D. (2001). Flaxseed as a functional food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 889-894.
- Ordoñez, M., Rovira, J., & Jaime, I. (2001). The relationship between the composition and texture of conventional and low-fat frankfurters. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 749-758.

- Osburn, W.N., & Keeton, J.T. (2004). Evaluation of low-fat sausage containing desinewed lamb and konjac gel. *Meat science*, 68(2), 221-233.
- Ospina, J.C., Cruz, A., Pérez-Álvarez, J.Á., & Fernández-López, J. (2010). Development of combinations of chemically modified vegetable oils as pork backfat substitutes in sausages formulation. *Meat science*, 84(3), 491-497.
- Oubiña, P., Sánchez-Muniz, F.J., Rodenas, S., & Cuesta, C. (2001). Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *British Journal of Nutrition*, 85(1), 41-47.
- Ovesen, L., Brot, C., & Jakobsen, J. (2003). Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: A vitamin D metabolite to be reckoned with? *Annals of Nutrition and Metabolism*, 47(3-4), 107-113.
- Paddon-Jones, D., Westman, E., Mattes, R.D., Wolfe, R.R., Astrup, A., & Westerterp-Plantenga, M. (2008). Protein, weight management, and satiety. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1558S-1561S.
- Paik, D.C., Wendel, T.D., & Freeman, H.P. (2005). Cured meat consumption and hypertension: an analysis from NHANES III (1988-94). *Nutrition Research*, 25(12), 1049-1060.
- Palomaki, A., Pohjantahti-Maaroos, H., Wallenius, M., Kankkunen, P., Aro, H., Husgafvel, S., Pihlava, J.-M., & Oksanen, K. (2010). Effects of dietary cold-pressed turnip rapeseed oil and butter on serum lipids, oxidized LDL and arterial elasticity in men with metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 9, 137.
- Palou, A., Picó, C., Bonet, M. L., Serra, F., Oliver, P., Rodríguez-Guerrero, A.M., & Ribot, J. (2008). *El libro blanco de las grasas en la alimentación fucional*. Unilever España S.A.
- Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A.M., Schulze, M.B., Manson, J.E., Willett, W.C., & Hu, F.B. (2011). Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(4), 1088-1096.

- Panagiotakos, D., Pitsavos, C., Chrysoshoou, C., Palliou, K., Lentzas, I., Skoumas, I., & Stefanadis, C. (2009). Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: A multivariate analysis of the ATTICA study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(4), 253-263.
- Paneras, E.D., & Bloukas, J.G. (1994). Vegetable-oils replace pork backfat for low-fat frankfurters. *Journal of Food Science*, 59(4), 725-728.
- Paneras, E.D., Bloukas, J.G., & Filis, D.G. (1998). Production of low-fat frankfurters with vegetable oils following the dietary guidelines for fatty acids. *Journal of Muscle Foods*, 9, 111-126.
- Pappa, I.C., Bloukas, J.G., & Arvanitoyannis, I.S. (2000). Optimization of salt, olive oil and pectin level for low-fat frankfurters produced by replacing pork backfat with olive oil. *Meat science*, 56(1), 81-88.
- Pardos, S.C., Torre, P.D., & Sánchez-Muniz, F.J. (2000). CLA antioxidant or prooxidant? *Grasas y Aceites*, 51(4), 268-274.
- Park, J., Rhee, K.S., & Ziprin, Y.A. (1990). Low-fat frankfurters with elevated levels of water and oleic acid. *Journal of Food Science*, 55(3), 871-872,874.
- Park, J., Rhee, S.K., Keeton, J.T., & Rhee, K.C. (1989). Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils. *Journal of Food Science*, 54(3), 500-504.
- Pedersen, J. I., James, P.T., Brouwer, I.A., Clarke, R., Elmadfa, I., Katan, M.B., Kris-Etherton, P.M., Kromhout, D., Margetts, B.M., Mensink, R.P., Norum, K.R., Rayner, M., & Uusitupa, M. (2011). The importance of reducing SFA to limit CHD. *British Journal of Nutrition*, 106(7), 961-963.
- Pelser, W.M., Linssen, J.P.H., Legger, A., & Houben, J.H. (2007). Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. *Meat science*, 75, 1-11.
- Perlo, F., Gagogago, A., Rosmini, M., Cerveraperez, R., Perezalvarez, J., Paganmoreno, M., Lopezasantovena, F., & Arandacatala, V. (1995). Modification of physico-chemical and colour parameters during the marketing of "paté". *Meat science*, 41(3), 325-333.
- Petzke, K.J., Lemke, S., & Klaus, S. (2011). Increased fat-free body mass and no adverse effects on blood lipid concentrations 4 weeks after additional meat consumption in comparison with an exclusion of meat in the diet of young healthy women. *Journal of nutrition and metabolism*, 2011, 210930.

- Pietrasik, Z., & Janz, J.A.M. (2010). Utilization of pea flour, starch-rich and fiber-rich fractions in low fat bologna. *Food Research International*, 43(2), 602-608.
- Pietrasik, Z., Jarmoluk, A., & Shand, P. J. (2007). Effect of non-meat proteins on hydration and textural properties of pork meat gels enhanced with microbial transglutaminase. *Lwt-Food Science and Technology*, 40(5), 915-920.
- Piscopo, S. (2009). The Mediterranean diet as a nutrition education, health promotion and disease prevention tool. *Public Health Nutrition*, 12(9A), 1648-1655.
- Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 113(1-4), 199-221.
- Raghu, B., & Venkatesan, P. (2008). Effect of n-3 fatty acid supplementation on blood glucose, lipid profile and cytokines in humans: A pilot study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(1), 85-88.
- Rahilly-Tierney, C.R., Lawler, E.V., Scranton, R.E., & Gaziano, J.M. (2009). Cardiovascular benefit of magnitude of low-density lipoprotein cholesterol reduction: a comparison of subgroups by age. *Circulation*, 120(15), 1491-1497.
- Ramírez-Tortosa, M. C., Granados, S., & Qiles, J. L. (2006). Chemical composition, types and characteristics of olive oil. In J. L. Qiles, M. C. Ramírez-Tortosa & P. Yaqoob (Eds.), *Olive oil and health* (pp. 45-61). Cambridge, USA: CABI Publishing.
- Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:404:0009:0025:ES:PDF>. In.
- Reglamento (UE) No 116/2010 del 9 de Febrero de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. In. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:037:0016:0018:ES:PDF>. F.

- Reglamento (UE) No 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:136:0001:0040:ES:PDF>.
- Rivera-Espinoza, Y., & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1-11.
- Rodríguez-Carpena, J. G., Morcuende, D., & Estévez, M. (2011). Partial Replacement of Pork Back-Fat by Vegetable Oils in Burger Patties: Effect on Oxidative Stability and Texture and Color Changes during Cooking and Chilled Storage. *Journal of Food Science*, 76(7), C1025-C1031.
- Roesch, R.R., & Corredig, M. (2002). Characterization of oil-in-water emulsions prepared with commercial soy protein concentrate *Journal of Food Science*, 67, 2837-2842.
- Romans, J.R., Costello, W.J., Carlson, C.W., Greaser, M.L., & Jones, K.W. (1994). *The meat we eat*. Danville, IL: Interstate Publisher, Inc.
- Rosmini, M.R., Perlo, F., Pérez-Álvarez, J.A., Pagan-Moreno, M.J., Gago-Gago, A., López-Santovenia, F., & Aranda-Catalá, V. (1996). TBA test by an extractive method applied to 'pate'. *Meat science*, 42(1), 103-110.
- Ruiz-Canela, M., & Martínez-González, M.A. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68(3), 245-250.
- Ruiz-Capillas, C., Aller-Guiote, P., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2006). Biogenic amine formation and nitrite reactions in meat batter as affected by high-pressure processing and chilled storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9959-9965.
- Ruiz-Capillas, C., Aller-Guiote, P., & Jiménez-Colmenero, F. (2007). Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. *Food Chemistry*, 101(2), 812-816.
- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2007a). Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat science*, 75(3), 397-405.

- Ruiz-Capillas, C., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. (2007b). Consequences of high-pressure processing of vacuum-packaged frankfurters on the formation of polyamines: Effect of chilled storage. *Food Chemistry*, 104(1), 202-208.
- Ruiz-Capillas, C., & Jimenez-Colmenero, F. (2004a). Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology*, 218(3), 237-241.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2004b). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 489-499.
- Ruiz-Capillas, C., & Jiménez-Colmenero, F. (2009). Biogenic amines in seafood products. In L.M.L. Nollet & F. Toldra (Eds.), *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis* (pp. 833-850). Boca Raton, USA: CRCPress, Member of Francis & Taylor Group.
- Ruiz-Capillas, C., & Moral, A. (2001). Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, 66(7), 1030-1032.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Herrero, A., & Jiménez Colmenero, F. (2011). New possibilities for fat reduction and improvement of fatty acid content in North African fresh sausage (merguez). *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(Suppl.3), 127.
- Russell, E.A., Lynch, A., Lynch, P.B., & Kerry, J.P. (2003). Quality and shelf life of duck liver Pate as influenced by dietary supplementation with alpha-tocopheryl acetate and various fat sources. *Journal of Food Science*, 68(3), 799-802.
- Ruusunen, M., Vainionpaa, J., Puolanne, E., Lyly, M., Lahteenmaki, L., Niemisto, M., & Ahvenainen, R. (2003). Effect of sodium citrate, carboxymethyl cellulose and carrageenan levels on quality characteristics of low-salt and low-fat bologna type sausages. *Meat science*, 64(4), 371-381.
- Ruusunen, M., Vainionpaa, J., Puolanne, E., Lyly, M., Lahteenmaki, L., Niemisto, M., & Ahvenainen, R. (2003). Physical and sensory properties of low-salt phosphate-free frankfurters composed with various ingredients. *Meat science*, 63(1), 9-16.
- Ryan, J.T., Ross, R.P., Bolton, D., Fitzgerald, G.F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9), 765-791.

- Sánchez de Medina Contreras, F. (2010). Metabolismo de los aminoácidos. In A. Gil (Ed.), *Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición* (pp. 321-344). Buenos Aires: Panamericana.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J. A., & Roncales, P. (2003). Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, 68(1), 339-344.
- Sánchez-Muniz, F.J. (2003). Lípidos. In M. García-Arias & M. García-Fernández (Eds.), *Nutrición y Dietética* (pp. 119-133): Universidad de León. Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales.
- Sánchez-Muniz, F. J. (2005). El aceite en la cocina. Utilización y normas para un uso adecuado. In J. A. Pinto Montanillo & J. R. Martínez Álvarez (Eds.), *Nutrición y Salud. El aceite de oliva y las dieta mediterránea* (Vol. 7, pp. 67-76). Alcobendas (Madrid): Instituto de Salud Pública. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Sanidad y Consumo.
- Sánchez-Muniz, F.J. (2007). Aceite de oliva, clave de vida en la cuenca mediterránea. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73, 653-692.
- Sánchez-Muniz, F.J. (2012). Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutricion Hospitalaria*, 27(1), 31-45.
- Sánchez-Muniz, F.J., García-Linares, M.C., García-Arias, M.T., Bastida, S., & Viejo, J. (2003). Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrition*, 133, 2302-2308.
- Sánchez-Muniz, F.J., & Nus, M. (2008). Importancia de la interacción dieta-genética en la prevención cardiovascular. In P. Vaquero (Ed.), *Genética, nutrición y enfermedad* (pp. 125-144). Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz y CSIC. EDIMSA. Editores Médicos, S.A.
- Sandhu, M.S., White, I.R., & McPherson, K. (2001). Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: A meta-analytical approach. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 10(5), 439-446.
- Santarelli, R.L., Pierre, F., & Corpet, D.E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 60(2), 131-144.

- Santos, C., Ordoñez, J.A., Cambero, I., D'Arrigo, M., & Hoz, L. (2004). Physicochemical characteristics of an alpha-linolenic acid and alpha-tocopherol-enriched cooked ham. *Food Chemistry*, 88(1), 123-128.
- Sayago-Ayerdi, S. G., Brenes, A., & Goñi, I. (2009). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *Lwt-Food Science and Technology*, 42(5), 971-976.
- Selgas, M. D., Salazar, P., & García, M.L. (2009). Usefulness of calcium lactate, citrate and gluconate for calcium enrichment of dry fermented sausages. *Meat science*, 82(4), 478-480.
- Serrano, A., Cofrades, S., & Jiménez-Colmenero, F. (2006). Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat science*, 72(1), 108-115.
- Serrano, A., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., & Jimenez-Colmenero, F. (2005). Nutritional profile of restructured beef steak with added walnuts. *Meat science*, 70(4), 647-654.
- Severini, C., De Pilli, T., & Baiano, A. (2003). Partial substitution of pork backfat with extra-virgin olive oil in 'salami' products: effects on chemical, physical and sensorial quality. *Meat science*, 64(3), 323-331.
- Shon, J., & Chin, K.B. (2008). Effect of whey protein coating on quality attributes of low-fat, aerobically packaged sausage during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, 73(6), C469-C475.
- Silva, J.G., Morais, H.A., Oliveira, A.L., & Silvestre, M.P.C. (2003). Addition effects of bovine blood globin and sodium caseinate on the quality characteristics of raw and cooked ham pate. *Meat science*, 63(2), 177-184.
- Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54(3), 438-463.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Sinha, R., Cross, A.J., Graubard, B.I., Leitzmann, M.F., & Schatzkin, A. (2009). Meat Intake and Mortality A Prospective Study of Over Half a Million People. *Archives of Internal Medicine*, 169(6), 562-571.

- Siri-Tarino, P.W., Sun, Q., Hu, F.B., & Krauss, R.M. (2010). Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), 535-546.
- Siu, N.C., Ma, C.Y., & Mine, Y. (2002). Physicochemical and structural properties of oat globulin polymers formed by a microbial transglutaminase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2660-2665.
- Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) (2001) Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Disponible en:
<http://www.nutricioncomunitaria.org/generica.jsp?tipo=docu&id=2>
- Södergren, E., Gustafsson, I.B., Basu, S., Nourooz-Zadeh, J., Nälsen, C., Turpeinen, A., Berglund, L., & Vessby, B. (2001). A diet containing rapeseed oil-based fats does not increase lipid peroxidation in humans when compared to a diet rich in saturated fatty acids. *Eur J Clin Nutr*, 55(11), 922-931.
- Soffer, T., Margalith, P., & Mannheim, C.H. (1994). Shelf-Life of Chicken liver egg pate in modified atmosphere packages. *International Journal of Food Science and Technology*, 29(2), 161-166.
- Soska, V., Jarkovsky, J., Ravcukova, B., Tichy, L., Fajkusova, L., & Freiburger, T. (2012). The logarithm of the triglyceride/HDL-cholesterol ratio is related to the history of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Clinical Biochemistry*, 45(1-2), 96-100.
- Spencer, E.A., Key, T.J., Appleby, P.N., Dahm, C.C., Keogh, R.H., Fentiman, I.S., Akbaraly, T., Brunner, E.J., Burley, V., Cade, J.E., Greenwood, D.C., Stephen, A.M., Mishra, G., Kuh, D., Luben, R., Mulligan, A.A., Khaw, K.-T., & Rodwell, S.A. (2010). Meat, poultry and fish and risk of colorectal cancer: pooled analysis of data from the UK dietary cohort consortium. *Cancer Causes & Control*, 21(9), 1417-1425.
- Stanley, J.C., El Som, R.L., Calder, P.C., Griffin, B.A., Harris, W.S., Jebb, S.A., Lovegrove, J.A., Moore, C.S., Riemersma, R.A., & Sanders, T.A.B. (2007). UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6 : n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*, 98(6), 1305-1310.

- Steenblock, R.L., Sebranek, J.G., Olson, D.G., & Love, J.A. (2001). The effects of oat fiber on the properties of light bologna and fat-free frankfurters. *Journal of Food Science*, 66(9), 1409-1415.
- Steffen, L.M., Kroenke, C.H., Yu, X.H., Pereira, M.A., Slattery, M.L., Van Horn, L., Gross, M.D., & Jacobs, D.R. (2005). Associations of plant food, dairy product, and meat intakes with 15-y incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(6), 1169-1177.
- Su, Y.K., Bowers, J.A., & Zayas, J.F. (2000). Physical characteristics and microstructure of reduced-fat frankfurters as affected by salt and emulsified fat stabilized with nonmeat proteins. *Journal of Food Science*, 65, 123-128.
- Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54.
- Sylvia, S. F., Claus, J.R., Marriott, N.G., & Eigel, W.N. (1994). Low-fat, high moisture frankfurters. Effects of temperature and water during extended mixing. *Journal of Food Science*, 59(5), 937-&.
- Tall, A.R. (1998). An overview of reverse cholesterol transport. *European Heart Journal*, 19, A31-A35.
- Tan, S.S., Aminah, A., Zhang, X.G., & Abdul, S.B. (2006). Optimizing palm oil and palm stearin utilization for sensory and textural properties of chicken frankfurters. *Meat science*, 72(3), 387-397.
- Tang, S., Kerry, J.P., Sheehan, D., Buckley, D.J., & Morrissey, P.A. (2001). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International*, 34(8), 651-657.
- Tapola, N.S., Lyyra, M.L., Karvonen, H.M., Uusitupa, M I., & Sarkkinen, E.S. (2004). The effect of meat products enriched with plant sterols and minerals on serum lipids and blood pressure. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(5), 389-397.
- Teixeira, R., Molina, M.D.B., Zandonade, E., & Mill, J.G. (2007). Cardiovascular risk in vegetarians and omnivores: a comparative study. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 89(4), 237-244.

- Temme, E.H.M., Mensink, R.P., & Hornstra, G. (1996). Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63(6), 897-903.
- Toldrá, F., & Reig, M. (2011). Innovations for healthier processed meats. *Trends in Food Science & Technology*, 22(9), 517-522.
- Triki, M., Jiménez-Colmenero, F., Herrero, A. M., & Ruiz-Capillas, C. (2012). Optimisation of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. *Food Chemistry*, 130(4), 1066-1073.
- Tye, R.J. (1991). Konjac flour: properties and applications. *Food Technology*, 45(3), 82-92.
- Ulbricht, T.L.V., & Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart-disease - 7 dietary factors. *Lancet*, 338(8773), 985-992.
- Valencia, I., Ansorena, D., & Astiasaran, I. (2007). Development of dry fermented sausages rich in docosaehaenoic acid with oil from the microalgae *Schizochytrium* sp.: Influence on nutritional properties, sensorial quality and oxidation stability. *Food Chemistry*, 104(3), 1087-1096.
- Valencia, I., O'Grady, M.N., Ansorena, D., Astiasaran, I., & Kerry, J.P. (2008). Enhancement of the nutritional status and quality of fresh pork sausages following the addition of linseed oil, fish oil and natural antioxidants. *Meat science*, 80(4), 1046-1054.
- Varela, G., Moreiras, O., Carbajal, A., & Campo, M. (1995). Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1991 (ENNA). Encuesta de presupuestos familiares 1990/91. Instituto Nacional de Estadística (INE).
- Vázquez-Velasco, M., Esperanza Díaz, L., Lucas, R., Gómez-Martínez, S., Bastida, S., Marcos, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2011). Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *British Journal of Nutrition*, 105(10), 1448-1452.
- Verma, A.K., Sharma, B.D., & Banerjee, R. (2010). Effect of sodium chloride replacement and apple pulp inclusion on the physico-chemical, textural and sensory properties of low fat chicken nuggets. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(4), 715-719.

- Viana, F.R., Silva, V.D.M., Delvivo, F.M., Bizzotto, C.S., & Silvestre, M.P.C. (2005). Quality of ham pate containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat science*, 70(1), 153-160.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. *Food Control*, 21(4), 436-443.
- Vural, H., Javidipour, I., & Ozbas, O. O. (2004). Effects of interesterified vegetable oils and sugarbeet fiber on the quality of frankfurters. *Meat science*, 67(1), 65-72.
- Wang, C., Harris, W. S., Chung, M., Lichtenstein, A. H., Balk, E. M., Kupelnick, B., Jordan, H. S., & Lau, J. (2006). n-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), 5-17.
- WCRF/AICR. (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research.
- WCRF/AICR. (2010). The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research.
- Wei, M., & Jacobson, T. (2011). Effects of Eicosapentaenoic Acid Versus Docosahexaenoic Acid on Serum Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Atherosclerosis Reports*, 13(6), 474-483.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V., & Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat science*, 86(1), 196-213.
- Wendland, E., Farmer, A., Glasziou, P., & Neil, A. (2006). Effect of alpha linolenic acid on cardiovascular risk markers: a systematic review. *Heart*, 92(2), 166-169.
- Welch, R. W., Antoine, J.-M., Berta, J.-L., Bub, A., de Vries, J., Guarner, F., Hasselwander, O., Hendriks, H., Jakel, M., Koletzko, B. V., Patterson, C. C., Richelle, M., Skarp, M., Theis, S., Vidry, S., & Woodside, J. V. (2011). Guidelines for the Design, Conduct and Reporting of Human Intervention Studies to Evaluate the Health Benefits of Foods. *British Journal of Nutrition*, 106, S3-S15.

- Whigham, L.D., Watras, A.C., & Schoeller, D.A. (2007). Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1203-1211.
- Whiting, R.C. (1987). Influence of lipid composition on the water and fat exudation and gel strength of meat batters. *Journal of Food Science*, 52(5), 1126-1129.
- Whitworth, J.A. (2003). 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*, 21(11), 1983-1992.
- WHO. (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control.
- WHO. (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of chronic diseases. In WHO (Ed.), *Technical Report Series*. Geneva (Switzerland).
- WHO. (2004). Draft global strategy on diet, physical activity and health.
- WHO. (2007). Global database on body mass index. In: World Health Organization.
- WHO. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. In. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- WHO. (2011a). Cardiovascular Diseases (CVDs). In *Fact Sheet N° 317*: World Health Organization.
- WHO. (2011b). Diabetes. In *Fact Sheet N° 312*: World Health Organization.
- WHO. (2011c). Global status report on noncommunicable diseases 2010. In. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- WHO. (2011d). Obesity and Overweight. In *Fact Sheet N° 311*: World Health Organization.
- WHO. (2011e). Spain. In *NCD Country Profiles*: World Health Organization.
- Wijendran, V., & Hayes, K.C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24, 597-615.
- Williamson, C.S., Foster, R.K., Stanner, S.A., & Buttriss, J.L. (2005). Red meat in the diet. *Nutrition Bulletin*, 30(4), 323-355.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S. I., & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat science*, 78(4), 343-358.
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., & Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat science*, 66, 21-32.

- Wyness, L., Weichselbaum, E., O'Connor, A., Williams, E. B., Benelam, B., Riley, H., & Stanner, S. (2011). Red meat in the diet: an update. *Nutrition Bulletin*, 36(1), 34-77.
- Yildiz-Turp, G., & Serdaroglu, M. (2008). Effect of replacing beef fat with hazelnut oil on quality characteristics of sucuk - A Turkish fermented sausage. *Meat science*, 78(4), 447-454.
- Yoo, S.S., Kook, S.H., Park, S.Y., Shim, J.H., & Chin, K.B. (2007). Physicochemical characteristics, textural properties and volatile compounds in comminuted sausages as affected by various fat levels and fat replacers. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9), 1114-1122.
- Yu, S.M., Derr, J., Etherton, T.D., & Krisetherton, P.M. (1995). Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(5), 1129-1139.
- Zhang, H., Yoshimura, M., Nishinari, K., Williams, M.A.K., Foster, T.J., & Norton, I.T. (2001). Gelation behaviour of konjac glucomannan with different molecular weights. *Biopolymers*, 59(1), 38-50.
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D.U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat science*, 86(1), 15-31.
- Zhou, N., & Mulvaney, S. J. (1998). The effect of milk fat, the ratio of casein to water, and temperature on the viscoelastic properties of rennet casein gels. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2561-2571.

ANEXOS

INFORMACIÓN del estudio: *Efecto del consumo de productos cárnicos (salchichas y patés), reformulados con un perfil lipídico optimizado, en sujetos con hipercolesterolemia leve y sobrepeso.*

Investigadores:

Begoña Olmedilla Alonso. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Francisco Jiménez Colmenero (ICTAN. CSIC).

Francisco Sánchez Muniz. Facultad Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Centros:

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Proyecto financiado por el programa Consolider-Ingenio 2010, CARNISENUSA CSD 2007-00016. Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I), Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Introducción

A través de esta hoja de información deseamos que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, léala con atención y le aclararemos las dudas que le puedan surgir. También puede consultar con las personas que considere oportuno antes de aceptar su participación.

Diversas instituciones como la Asociación Estadounidense del Corazón (*American Heart Association*, AHA), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han propuesto pautas nutricionales para disminuir la elevada incidencia de las enfermedades cardiovasculares (ECV), enormemente relacionadas con la dieta y la calidad lipídica de los alimentos consumidos. Dentro de estas pautas se establecen unas ingestas recomendadas para las grasas y el tipo de grasa a consumir en la dieta, promoviéndose una disminución en el consumo de grasas animales frente a las de origen vegetal y marino.

De acuerdo con las ingestas recomendadas por la Organización Mundial de la Salud, en términos de energía total, la cantidad de ácidos grasos saturados (AGS) no debería pasar del 10%, la de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) del 6-10% (donde del 5-8% debería ser de omega-6 y del 1-2% de omega-3) y alrededor de un 10-15% debería provenir de ácidos grasos monoinsaturados (AGM). En cuanto a los ácidos grasos omega-3, las recomendaciones están entre 1,4 y 3 g/día o incluso valores superiores, mientras que para los ácidos grasos omega-3 de cadena larga estas recomendaciones oscilan entre 180-1000 mg/día (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA).

El consumo de patés y salchichas está bastante extendido dentro de la población española y el tipo de grasa utilizada en estos productos les confiere una composición nutricional (a nivel de grasas) que se aleja de las recomendaciones nutricionales. Es por ello por lo que, en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, se han fabricado productos cárnicos (salchichas y patés) con grasas más saludables y en proporciones adecuadas respecto a las ingestas recomendadas. La reformulación de productos cárnicos tipo paté o salchichas se ha llevado a cabo mediante la incorporación de aceites vegetales (de oliva y de linaza) ricos en ácidos grasos poli y monoinsaturados, así como de un aceite de pescado que aporta al producto ácidos grasos omega-3 de cadena larga.

Los productos que se consumirán en este estudio contienen una cantidad de ácidos grasos omega-3 entre 2,5 g/100 g (de los cuales 2 g son de ácido alfa linolénico y 0,5 g de ácidos docosahexaenoico y eicosapentaenoico) y 3,7 g/100 g (de los cuales 2,7 g son de ácido alfa linolénico y 0,69 g de ácidos docosahexaenoico y eicosapentaenoico).

Este estudio se lleva a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (CSIC), en colaboración con la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. El **objetivo** es valorar el efecto del consumo de productos cárnicos (salchichas y patés) con una composición grasa modificada (sustituyendo la grasa animal por aceites de origen vegetal y marino) sobre los niveles de colesterol, triglicéridos y diversos marcadores de estatus antioxidante e inflamatorio, así como de la presión arterial.

Descripción general del estudio

Los participantes deben ser mayores de edad y tener un índice de masa corporal entre 25 y 30 kg/m², una concentración de colesterol en sangre en el rango entre 200 y 250 mg/dl, no deben utilizar fármacos, suplementos dietéticos ni ningún otro producto para controlar su peso, ni fármacos antihipertensivos, así como tampoco consumir de forma habitual alimentos enriquecidos con ácidos grasos omega-3 (ej. en huevos, leche, galletas, pescados enlatados).

Los voluntarios deben estar dispuestos a consumir 200 g de salchichas y 250 g de paté a la semana.

En el estudio participarán 32 personas durante 20 semanas (5 meses). El estudio se divide en tres periodos en los cuales se consumen productos cárnicos con diferente contenido de grasa y se realizará en el orden siguiente (por motivos de producción de los productos):

1ª parte: productos cárnicos con 15 % de grasa (se reduce la cantidad de grasa del producto tipo).

Estos productos se obtienen a partir de la materia prima utilizada industrialmente para la elaboración de salchichas y patés (carne y tocino de cerdo e hígado en el caso de los patés) reduciendo la cantidad grasa hasta un 15% mediante procedimientos tecnológicos utilizados por la industria alimentaria.

2ª parte: productos cárnicos con 15 % de grasa (que aportarán 1,9 g de ácidos grasos omega-3 /día).

Los productos consumidos en esta segunda parte del estudio son elaborados de la misma forma que se indica en el apartado anterior, pero con la diferencia de que el tocino es sustituido aquí por una mezcla de aceites de origen vegetal y marino (elaborada a partir de materias primas adquiridas a proveedores de industrias alimentarias).

3ª parte: productos cárnicos control (del tipo de los que se encuentran habitualmente en el mercado), con 30% de grasa el paté y 18 % de grasa las salchichas.

Cada uno de estos periodos tiene una duración de 4 semanas y entre periodos hay un espacio de cuatro semanas sin aporte de los productos cárnicos en estudio y en el que pueden seguir con hábitos de alimentación habituales.

Los participantes acudirán al ICTAN (C/ José Antonio Novais, 4. Madrid-28040) en seis ocasiones a lo largo del estudio, en ayunas (de 10 h), para la extracción de sangre (aprox. 15 ml) y con una muestra de orina (la primera de la mañana).

Al inicio de cada uno de los tres periodos de intervención, se entregarán los envases de paté y salchichas, que deberán permanecer almacenados en refrigeración. Los paquetes abiertos deberán consumirse en un plazo máximo de 7 días.

Esquema del estudio:

Día 0: Inclusión de los sujetos tras ser informados y firmar su consentimiento. Extracción de sangre y recogida de muestra de orina, medida de parámetros antropométricos (peso, talla, perímetro cintura) y medición de la presión arterial. Entrega de los envases de paté y salchichas (15% grasa).

Día 29: Extracción de sangre y recogida de muestra de orina, medida de parámetros antropométricos y medición de la presión arterial.

Fin de la primera parte del estudio e inicio de un período de 4 semanas sin intervención dietética.

Día 58: *Inicio del segundo periodo de intervención.*

Extracción de sangre y recogida de muestra de orina, medida parámetros antropométricos y medición de la presión arterial. Entrega de los envases de paté y salchichas (15% grasa, conteniendo ácidos grasos omega-3).

Día 87: Extracción de sangre y recogida de muestra de orina, medida parámetros antropométricos y medición de la presión arterial.

Fin de la segunda parte del estudio e inicio de un período de 4 semanas sin intervención dietética.

Día 116: *Inicio del tercer periodo de intervención.* Extracción de sangre y recogida de muestra de orina, medida parámetros antropométricos y medición de la presión arterial. Entrega de los envases de paté y salchichas (tipo de los habituales en el mercado).

Día 145: Extracción de sangre y recogida de muestra de orina, medida parámetros antropométricos y medición de la presión arterial. *Finalización del estudio.*

Beneficios esperables del estudio

Los productos cárnicos utilizados en este estudio están elaborados para mejorar su perfil graso respecto a los productos del mismo tipo existentes en el mercado. Contienen menos AGS y mayor cantidad de AGP y AGM aportados por los aceites vegetales, así como un alto contenido en ácidos grasos omega-3. La modificación del perfil lipídico de los productos cárnicos intenta contribuir a alcanzar las recomendaciones nutricionales establecidas por la Organización Mundial de la Salud y de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria.

Los AGM tienen efectos a nivel del perfil lipídico del suero, aumentando el HDL colesterol y disminuyendo los triglicéridos, mientras que los AGP disminuyen los contenidos del colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad manteniendo los niveles del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad. Dentro de los AGP, los AGP omega-3 de cadena larga reducen el nivel de triglicéridos en suero y están asociados con reducción de riesgo de contraer enfermedad cardiovascular.

Por ello, se espera que el aporte de los ácidos grasos (y su proporción) en los productos cárnicos en estudio contribuyan, dentro del contexto de una dieta variada, a una variación beneficiosa en el perfil lipídico de los voluntarios.

Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento.

Confidencialidad

La identidad de los participantes estará preservada durante la manipulación de muestras y de datos, de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de Datos (LOPD) 15/1999 de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, así como el R.D. 1720/2007, que aprueba el reglamento de desarrollo de la LOPD. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio. El estudio se lleva a cabo siguiendo la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (Ley 14/2007).

Compensación económica

Se contempla una pequeña compensación económica de 300 euros por los gastos derivados de la participación (ej. para transporte, desayunos).

Otra información relevante

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

Mientras permanezca en este estudio no deberá participar en ningún otro ensayo clínico.

Gracias por su interés.

Si desea participar, preguntar cualquier duda o solicitar más explicaciones, puede contactar con:

Dra. Begoña Olmedilla Alonso
Dpto de Metabolismo y Nutrición.
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. CSIC.
Tel: 915492300 ext 392
e-mail: Bolmedilla@ictan.csic.es

Consentimiento informado

Estudio: Efecto del consumo de productos cárnicos (salchichas y patés), reformulados con un perfil lipídico optimizado, en sujetos con hipercolesterolemia leve y sobrepeso.

Proyecto del programa Consolider-Ingenio 2010, CARNICENUSA CSD 2007-00016.

Investigadores: Begoña Olmedilla Alonso (ICTAN)
Francisco Jiménez Colmenero (ICTAN)
Francisco Sánchez Muniz (UCM)

Centros:

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). CSIC. C/ José Antonio Novais, 10. 28040-Madrid.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Yo, (nombre y apellidos).....
con DNI nº, residente en
calle/ plaza
he recibido la información necesaria por parte del Dr/a
sobre el proyecto titulado “Efecto del consumo de productos cárnicos (salchichas y patés), reformulados con un perfil lipídico optimizado, en sujetos con hipercolesterolemia leve y sobrepeso” que se lleva a cabo en el ICTAN del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Considero que la información recibida ha sido relevante, clara y suficiente, la he entendido y he formulado todas las preguntas y dudas que me ha podido suscitar, habiendo sido respondidas satisfactoriamente en su totalidad.

Entiendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones. Por tanto, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras de sangre obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados con el objetivo del estudio actual: Sí / No

Madrid, de de 2011

Fdo:
Nombre y firma del investigador

Fdo:
Nombre y firma del voluntario

**D^a. LOURDES CABRERA GARCÍA, SECRETARIA DEL COMITÉ ETICO DE
INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA
DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID**


C E R T I F I C A

Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado:

**“EFECTO DEL CONSUMO DE PRODUCTOS CÁRNICOS (SALCHICHAS Y
PATÉS), REFORMULADOS CON UN PERFIL LIPÍDICO OPTIMIZADO, EN
SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA LEVE Y SOBREPESO”**

del que es investigadora principal la Dra. Begoña Olmedilla Alonso,
considerando que su planteamiento es correcto desde el punto de vista metodológico y
ético. Acta nº 261 de fecha 20/12/10

En Madrid, a 13 de diciembre de 2010



Hospital Universitario
Puerta de Hierro
Majadahonda
SaludMadrid
Comunidad de Madrid
Comité Ético de Investigación
Clínica

Fdo.: Dra. Cabrera García
Secretaria C.E.I.C.

